

Die Protektion gegen den myokardialen Reperfusionsschaden durch Hemmung der Glykogen-Synthase-Kinase-3 β

WISAM IRAQI



INAUGURALDISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Doktors der Medizin**
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2011

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Die Protektion gegen den myokardialen Reperfusionsschaden durch Hemmung der Glykogen-Synthase-Kinase-3 β

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Wisam Iraqi

aus Kfar-Saba

Gießen 2010

Aus dem Physiologischen Institut
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Klaus-Dieter Schlüter

Gutachter: Prof. Dr. Dr. H. Michael Piper
Gutachter: Prof. Dr. Klaus T. Preissner

Tag der Disputation: 11.03.2011

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ
“وَقُلْ رَبِّ زِدْنِي عِلْمًا”
“سُبْحَانَكَ لَا عِلْمَ لَنَا إِلَّا مَا عَلَّمْتَنَا إِنَّكَ أَنْتَ الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ”

إهداء

أهدي هذه الرسالة لوالديّ حُسنِي وَسَمِيَّة عراقي
ولعمّتي عائِشَة ورَشيقة عراقي
ولإخوتي إسلام وحافظ وصامد عراقي
ولكل من علّمني خاصّة الأستاذ الجليل والمُربي الكبير مُحَمَّد شبيطه

*Meinen Eltern Husni und Samia Iraqi,
meinen Tanten Aisha und Rashika Iraqi,
meinen Brüdern Islam, Hafith und Samid Iraqi,
und meinen Lehrern besonders Herrn Muhammad Shbitah
gewidmet*

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN	1
1 EINLEITUNG	4
1.1 Der myokardiale Reperfusionsschaden	4
1.1.1 Ischämie, Reperfusion und Reperfusionsschaden	4
1.1.2 Mechanismen des akuten myokardialen Reperfusionsschadens	5
1.1.3 Protektion gegen den myokardialen Reperfusionsschaden	9
1.2 Glykogen-Synthase-Kinase-3β und der Reperfusionsschaden	11
1.2.1 Glykogen-Synthase-Kinase-3 β	11
1.2.2 Kardioprotektion durch die Hemmung der GSK-3 β	12
1.3 Ziele der Arbeit	13
2 MATERIAL	14
2.1 Chemikalien	14
2.2 Häufig verwendete Medien und Puffer	17
2.2.1 Zellkulturmedien	17
2.2.2 Perfusionsmedien	18
2.2.3 Inkubationsmedien	19
2.3 Geräte und Laborbedarf	20
3 METHODEN	23
3.1 Herzmuskelzellisolierung und Zellkultur	23
3.1.1 Versuchstiere	23
3.1.2 Herzmuskelzellpräparation	23
3.1.3 Zellkultur	25
3.2 Anoxie-Reoxygenation-Experimente	25
3.2.1 Versuchsaufbau	25
3.2.2 Video-Imaging-System für fluoreszenzmikroskopische Messungen	26
3.2.3 Messung der intrazellulären Ca ²⁺ -Konzentration	27
3.2.4 Detektion der MPTP-Öffnung mit der Calcein-Cobalt-Methode	27
3.2.5 Messung des mitochondrialen Membranpotentials mit JC-1	28
3.2.6 Messung des intrazellulären pH-Wertes	28
3.2.7 Testen der Funktion des Na ⁺ /H ⁺ -Austauschers	29

3.2.8 Nekrosedetektion	30
3.2.9 Experimentelles Protokoll	30
3.2.10 Messparameter	31
3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	32
3.3.1 Vorbehandlung der Kardiomyozyten	32
3.3.2 Probenvorbereitung und Proteinmengenbestimmung	32
3.3.3 Durchführung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	34
3.3.4 Western-Blot	36
3.3.5 Reversible Proteinfärbung mit Ponceau S	36
3.3.6 Immunologischer Nachweis	37
3.4 GSK-3β-Aktivitätsmessung	38
3.4.1 Probenvorbereitung und Proteinmengenbestimmung	38
3.4.2 GSK-3 β -Immunopräzipitation	40
3.5 Statistik	41
4 ERGEBNISSE	42
4.1 Proteingehalt, Phosphorylierung und Aktivität von GSK-3β während Ischämie und Reperfusion	42
4.1.1 GSK-3 β -Proteingehalt unter Normoxie, Anoxie, Reoxygenation und Reoxygenation in Anwesenheit von SB216763	42
4.1.2 Phosphorylierung der GSK-3 β an Serin 9 unter Normoxie, Anoxie, Reoxygenation und Reoxygenation in Anwesenheit von SB216763	43
4.1.3 Phosphorylierung der GSK-3 β an Tyrosin 216 unter Normoxie, Anoxie, Reoxygenation und Reoxygenation in Anwesenheit von SB216763	44
4.1.4 GSK-3 β -Aktivität unter Normoxie, Anoxie, Reoxygenation und Reoxygenation in Anwesenheit von SB216763	45
4.2 Zeitverlauf der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration und der Zelllänge isolierter Kardiomyozyten während Ischämie und Reperfusion	46
4.2.1 Exemplarischer Verlauf der zytosolischen Ca ²⁺ -Konzentration während simulierter Ischämie und Reperfusion	46
4.2.2 Exemplarischer Verlauf der Zelllänge während Ischämie und Reperfusion	47
4.3 Beeinflussung des Reperfusionsschadens durch Hemmung der GSK-3β	48
4.3.1 Einfluss von Inhibitoren der GSK-3 β auf die Zelllänge der Kardiomyozyten	48
4.3.2 Auswirkung der Inhibitoren der GSK-3 β auf die Entwicklung der Nekrose	49

4.3.3 Einfluss der GSK-3 β -Inhibitoren auf die zytosolischen Ca ²⁺ -Oszillationen	50
4.4 Auswirkung der GSK-3β-Hemmung auf die mitochondriale Integrität	51
4.4.1 Auswirkung der GSK-3 β -Hemmung auf die Öffnung der mitochondrialen Permeabilität-Transition-Poren	51
4.4.2 Exemplarischer Zeitverlauf des mitochondrialen Membranpotentials während Ischämie und Reperfusion	52
4.4.3 Effekt der GSK-3 β -Hemmung auf das mitochondriale Membranpotential	53
4.5 Beeinflussung des Reperfusionsschadens durch GSK-3β-Hemmung unter Blockade der MPTP-Öffnung	54
4.5.1 Beeinflussung der Zelllänge durch SB216763 und Cyclosporin A	54
4.5.2 Einfluss von SB216763 und Cyclosporin A auf die Nekroseentwicklung	55
4.5.3 Effekt von SB216763 und Cyclosporin A auf das mitochondriale Membranpotential	56
4.6 Beeinflussung des zytosolischen pH durch Hemmung der GSK-3β	57
4.6.1 Veränderungen des zytosolischen pH-Wertes während Ischämie und Reperfusion	57
4.6.2 Einfluss von SB216763 auf den zytosolischen pH-Wert während der Reperfusion	58
4.6.3 Beeinflussung des Na ⁺ /H ⁺ -Austauschers durch die Hemmung der GSK-3 β	59
5 DISKUSSION	60
5.1 Status der GSK-3 β während Ischämie und Reperfusion	60
5.2 Protektion gegen den Reperfusionsschaden durch die GSK-3 β -Inhibitor	61
5.3 Die GSK-3 β -Inhibition und die pH-Erholung der Kardiomyozyten	65
5.4 Klinische Aspekte	70
6 ZUSAMMENFASSUNG	72
7 SUMMARY	73
8 LITERATURVERZEICHNIS	74
9 ERKLÄRUNG	86
10 DANKSAGUNG	87
11 LEBENSLAUF	88

ABKÜRZUNGEN

AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
AM	Acetoxymethylester
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser (aqua bidestillata)
ATP	Adenosintriphosphat
BDM	2,3-Butanedione monoxime
BisAA	Bisacrylamid
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
Ca ²⁺	Kalzium-Ionen
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CCD Kamera	Charge-coupled Device Kamera
CCT	Kreatin-Karnitin-Taurin
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzenimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoCl ₂	Cobaltchlorid
Csp A	Cyclosporin A
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis-(beta-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
et al.	und andere
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
g	Gramm
GSK-3	Glykogen-Synthase-Kinase-3
GSK-3β~P	Phosphorylierte GSK-3β
h	Stunde/n (hour)
H ⁺	Wasserstoff-Ionen

H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HRP	Horseradish-Peroxidase
IgG	Immunglobulin G
IU	Internationale Einheiten
K ⁺	Kalium-Ionen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenkarbonat
Kont	Kontrolle
LiCl	Lithiumchlorid
M	Mol / Liter
mA	Milliampère
mAk	monoklonaler Antikörper
MCU	mitochondriales Ca ²⁺ -Uniporter
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium-Ionen
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute/n
mm	Millimeter
mM	Millimol / Liter
ml	Milliliter
MPTP	Mitochondriale Permeabilität-Transition-Pore/n
µg	Mikrogramm
µM	Mikromol / Liter
µl	Mikroliter
N ₂	Stickstoff
Na ⁺	Natrium-Ionen
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NH ₃	Ammoniak

NH_4^+	Ammonium
NH_4Cl	Ammoniumchlorid
nm	Nanometer
nM	Nanomol / Liter
NO	Stickstoffmonoxid
Norm	Normoxie
l	Liter
O_2	Sauerstoff
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
pAK	polyklonale Antikörper
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H^+ -Konzentration
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PKG	Proteinkinase G
r.E.	relative Einheiten
Reox	Reoxygenation
s	Sekunde
SDS	Natrium (Sodium)-Dodecylsulfat
SEM	Standardabweichung des Mittelwerts
Ser	Serin
SERCA	Ca^{2+} -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulum
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (Tris buffered saline)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tyr	Tyrosin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomet
U/ml	Units / Milliliter
×g	x-fache Erdbeschleunigung
$\Delta\Psi$	Membranpotential
%	Prozent
% (vol/vol)	Volumenprozent (volume per volume)
% (wt/vol)	Gewichtsprozent (weight per volume)

1 EINLEITUNG

1.1 Der myokardiale Reperfusionsschaden

1.1.1 Ischämie, Reperfusion und Reperfusionsschaden

Die Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems sind die Haupttodesursache in der Bundesrepublik Deutschland und in den anderen entwickelten Industriestaaten. In diesem Zusammenhang kommt dem akuten Myokardinfarkt, als die häufigste zum Tod führende kardiovaskuläre Komplikation, eine besondere Bedeutung zu. Eine starke Einschränkung oder Unterbrechung der koronaren Durchblutung -und damit der Sauerstoffversorgung des Myokards- führt zu einem Verlust der aeroben Energiegewinnung in den Mitochondrien der Herzmuskelzellen. Dieses Missverhältnis von Sauerstoffzufuhr und Sauerstoffbedarf des Myokards wird als Ischämie bezeichnet.

Das akute Bild des Myokardinfarktes wird vom Verlust der Pumpfunktion des Herzens durch einen Ischämie-bedingten Untergang des kontraktile Gewebes bestimmt. Das Überleben der Patienten hängt wesentlich von der schnellen Aufhebung der Ischämie und Wiederherstellung der Durchblutung ab. Das möglichst schnelle Wiedereröffnen verschlossener Herzkranzgefäße, die Reperfusion, ist heute die Therapie der Wahl beim akuten Myokardinfarkt. Sie ist die wirksamste Methode, die das Infarktgebiet eingrenzen und das restliche Myokardgewebe vor der voranschreitenden Schädigung durch den Sauerstoff- und Substratmangel bewahren kann.

Nach der Reperfusion wird die langfristige Prognose wesentlich von der Größe des beschädigten Infarktgebietes und vom Remodelling des nichtischämischen Myokards bestimmt. Dabei hängt das Ausmaß der negativen Folgen eines Herzinfarktes wie Narbenbildung und Verlust des kontraktile Gewebes nicht nur von Faktoren ab, die ihren Ursprung in der Ischämie haben, sondern auch von zellulären Prozessen, die sich erst in der Reperfusion ereignen. Die Schäden an den Herzmuskelzellen, die erst durch diese Reperfusion-induzierten Vorgänge zustande kommen, werden als myokardialer Reperfusionsschaden bezeichnet [Piper et al., 1998; Garcia-Dorado, 2004].

Aus tierexperimentellen Studien ist seit längerem bekannt, dass der Reperfusionsschaden durch Interventionen in der Frühphase der Reperfusion deutlich reduziert werden kann [Piper et al., 2004; Garcia-Dorado et al., 2006; Yellon und Hausenloy, 2007].

In den letzten Jahren konnten vermehrt Nachweise dafür erbracht werden, dass der Reperfusionsschaden auch am menschlichen Myokard in der frühen Reperusionsphase reduziert und günstig beeinflusst werden kann [Staat et al., 2005; Kitakaze et al., 2007].

1.1.2 Mechanismen des akuten myokardialen Reperfusionsschadens

Während der Ischämie sind die Herzmuskelzellen wegen des Ausfalls der oxidativen Atmung in den Mitochondrien auf die anaerobe Energiegewinnung angewiesen. Hierbei führen die Glykolyse und die vermehrte Bildung von Milchsäure zu einer Azidose des ischämischen Myokards [Owens et al., 1996]. Durch den persistierenden Sauerstoffmangel und die fortschreitende Ansäuerung kommt letztendlich auch die anaerobe ATP-Produktion zum Stillstand, was zu einem manifesten Energiedefizit führt. Unter diesen Umständen kann die Aktivität der zellulären ATP-abhängigen Prozesse nicht mehr aufrecht erhalten werden.

In diesem Zusammenhang kann das über die Zellmembran einströmende Na^+ (vor allem durch die Na^+ -Kanäle und den Na^+/H^+ -Austauscher) aufgrund der deutlich verminderten oder vollständig unterbrochenen Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase nicht mehr aktiv aus der Zelle entfernt werden [Ladilov et al., 1995]. Die daraus resultierende Erhöhung der zytosolischen Na^+ -Konzentration [Anderson et al., 1990; Pike et al., 1993] und damit die Reduzierung des transsarkolemmalen Na^+ -Gradienten aktiviert den membranständigen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher in der Rückwärtsrichtung, wobei Na^+ aus der Zelle ausströmt und Ca^{2+} in die Zelle einströmt und eine Ca^{2+} -Überladung des Zytosols verursacht [Haigney et al., 1992; Ladilov et al., 1999; Schäfer et al., 2001].

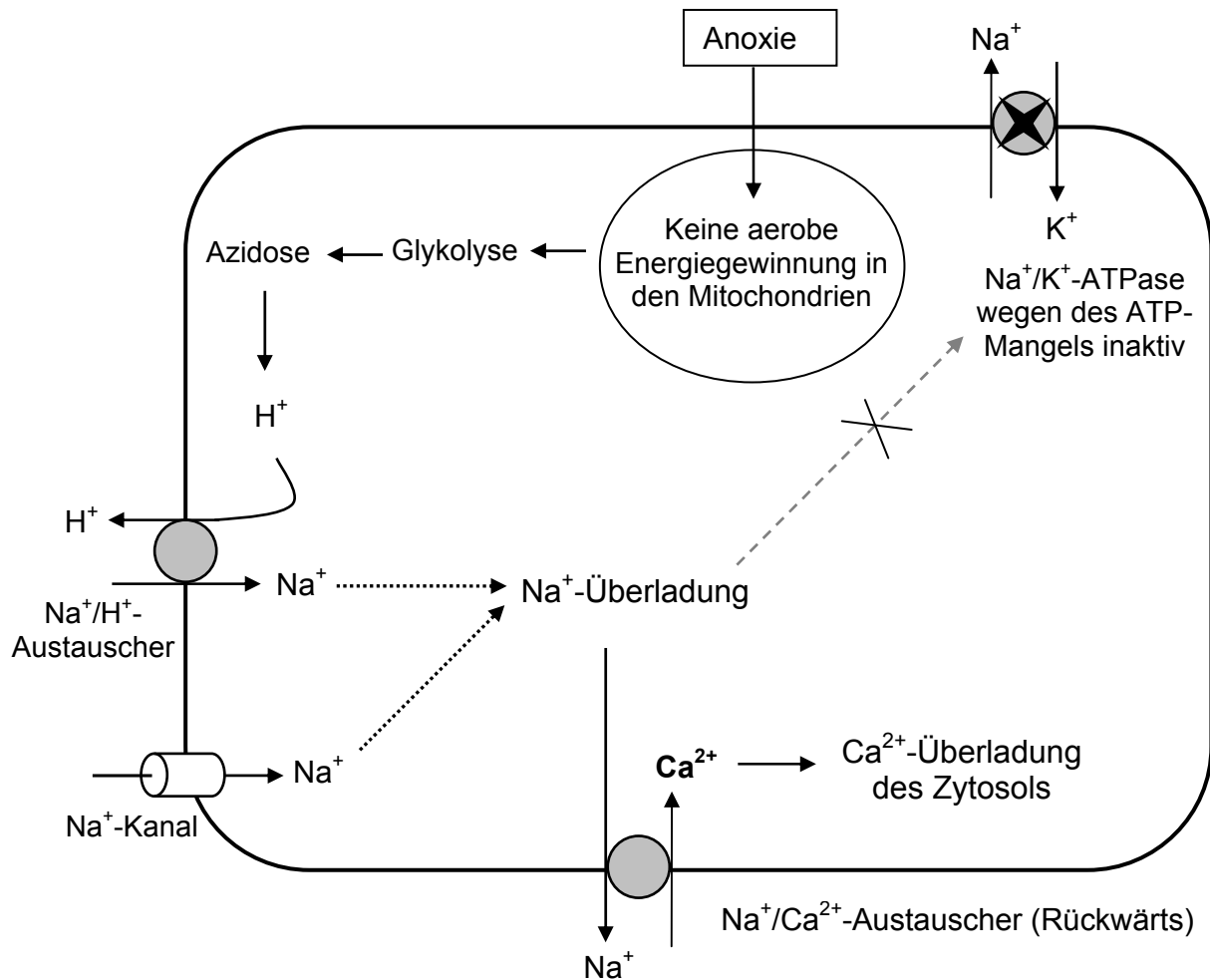


Abb. 1.1 Die Entwicklung der zytosolischen Na^+ - und Ca^{2+} -Überladung während der simulierten Ischämie.

Diese Ca^{2+} -Überladung ist pathophysiologisch von großer Bedeutung, weil durch sie eine Überaktivierung zellulärer Ca^{2+} -abhängiger Vorgänge wie des Aktin-Myosin-Apparates und verschiedener potentiell schädlicher Proteasen und Lipasen zustande kommt. Allerdings spendet die in der Ischämie vorherrschende Azidose den Kardiomyozyten einen gewissen Schutz, indem sie einer solchen Überaktivierung entgegenwirkt, da die schädlichen Ca^{2+} -abhängigen Vorgänge im azidotischen Zytosol deutlich verlangsamt sind [Ladilov et al., 1995].

Außer der Ca^{2+} -Überladung ereignet sich während der Ischämie ein weiteres Phänomen: eine pathologische Zellverkürzung unter Beibehaltung der Querstreifung, die Kontraktur. Dabei handelt es sich um eine Ca^{2+} -unabhängige Kontraktur vom „Rigor-Typ“, die durch einen kritisch niedrigen intrazellulären ATP-Spiegel hervorgerufen wird. Dabei führt ein zytosolischer ATP-Spiegel von $<100 \mu M$ zur Bildung einzelner Querbrücken zwischen Aktin- und Myosinfilamenten, was

wiederum in einer Ca^{2+} -unabhängigen Aktivierung des Querbrückenzyklus entlang der Myofilamente resultiert [Nichols und Lederer, 1990; Ventura-Clapier und Veksler, 1994].

Während der Reperfusion ermöglicht die Beendigung des Sauerstoffmangels den Kardiomyozyten die oxidative ATP-Synthese in den Mitochondrien wiederaufzunehmen. Der nun erhöhte zytosolische ATP-Spiegel führt zusammen mit der endischämischen Ca^{2+} -Überladung zur Aktivierung der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase (SERCA), die Ca^{2+} vom Zytosol ins Sarkoplasmatische Retikulum (SR) aktiv transportiert. Wenn die Speicherkapazität des SR überschritten wird, öffnen sich die Ca^{2+} -Kanäle des SR, die Ryanodin-Rezeptoren, und verursachen eine Ca^{2+} -Freisetzung zurück ins Zytosol [Piper et al., 2006]. Durch diesen, sich dauernd wiederholenden Akt der Ca^{2+} -Aufnahme ins SR und der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR ins Zytosol, entstehen zytosolische Ca^{2+} -Oszillationen. In dieser Situation der Reperfusion-induzierten schnellen Reenergetisierung und Realkalisierung führen diese Ca^{2+} -Oszillationen zu einer überschießenden Aktivierung des kontraktile Apparates und lösen damit eine Kontraktur vom „ Ca^{2+} -Typ“, die Hyperkontraktur, aus [Siegmund et al., 1992; Abdallah et al., 2006].

Die Hyperkontraktur entsteht innerhalb der ersten Minuten der Reperfusion und zeigt sich mikroskopisch an isolierten Kardiomyozyten als schnell einsetzende und mit einem Verlust der Querstreifung einhergehende Zellverkürzung unmittelbar nach Beginn der Reperfusion [Siegmund et al., 1991]. In vivo, wo die schnelle Entwicklung der Hyperkontraktur ebenfalls zu beobachten ist [Garcia-Dorado et al., 1992, 1997], bleibt die Hyperkontraktur-induzierte Schädigung nicht auf die einzelne Zelle beschränkt, sondern breitet sich unter benachbarten Zellen aus und bildet damit das histologische Bild der sogenannten Kontraktionsbandennekrosen [Ganote, 1983], die sich als Nekrosen der Kardiomyozyten mit sarkolemmalen Brüchen und teils hyperkontrahierten, teils zerrissenen Resten der myofibrillären Struktur zeigen.

Eine Reihe von Befunden aus verschiedenen Studien legt nahe, dass die Hyperkontraktur die Hauptursache für den Reperfusion-induzierten Zelltod ist. In diesem Zusammenhang wurden zwischen dem Ausmaß der Hyperkontraktur auf der einen Seite und der Ausbreitung der Kontraktionsbandennekrosen auf der anderen Seite enge Korrelationen nachgewiesen [Garcia-Dorado et al., 1997; Inserte et al., 2002]. Außerdem verhindert eine vorübergehende direkte Hemmung des kontraktile Apparates der Kardiomyozyten mit BDM (2,3-Butanedione monoxime) am Anfang

der Reperfusion die Entstehung der Hyperkontraktur und reduziert damit wirksam die Entwicklung der Kontraktionsbandennekrosen [Schlack et al., 1994; Sebbag et al., 2003].

Neben der Hyperkontraktur induzieren die zytosolischen Ca^{2+} -Oszillationen einen Ca^{2+} -Einstrom in die Mitochondrien, deren Überladung mit Ca^{2+} zur Öffnung mitochondrialer Permeabilität-Transition-Poren (MPTP) führen kann [Halestrap et al., 2004]. Die MPTP sind Kanäle, die eine direkte Verbindung der mitochondrialen Matrix mit dem Zytosol herstellen und für große Moleküle bis 1,5 kDa durchgängig sind. Die Öffnung der MPTP erfolgt schon in den ersten Minuten der Reperfusion, allerdings geschieht das nicht in jeder Zelle und nicht an allen Mitochondrien einer Zelle gleichzeitig [Di Lisa, 2001; Griffiths, 2009]. Mitochondrien mit MPTP-Öffnung können weder an der Beseitigung der zytosolischen Ca^{2+} -Überladung noch an der aeroben Energiegewinnung teilnehmen. Beides resultiert in einer verminderten Erholung der Kardiomyozyten bis hin zum Zelltod im absoluten Energiemangel [Piper et al., 2008].

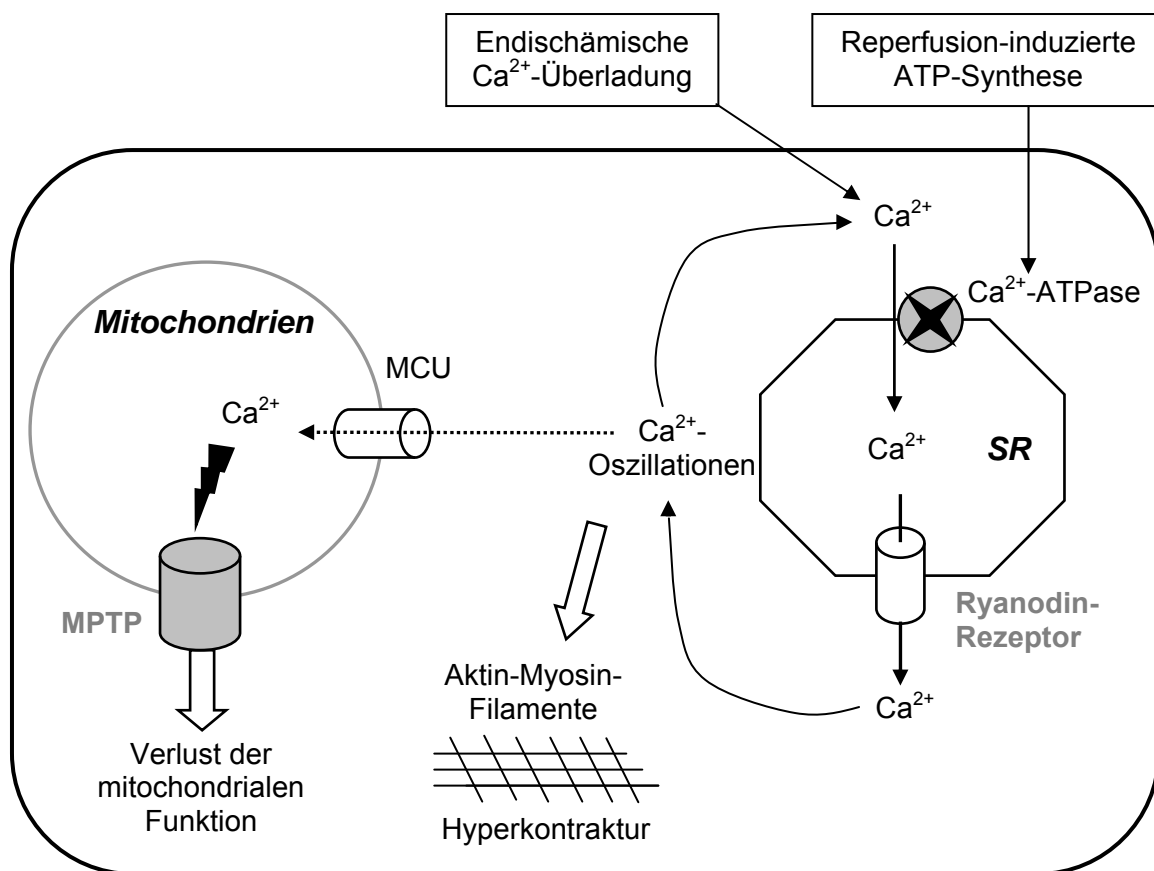


Abb. 1.2 Entstehung der zytosolischen Ca^{2+} -Oszillationen, Hyperkontraktur und MPTP-Öffnung während der simulierten Reperfusion.

1.1.3 Protektion gegen den myokardialen Reperfusionsschaden

Die große Anzahl an Studien, die in den letzten Jahren sowohl an isolierten Herzen als auch an isolierten Kardiomyozyten durchgeführt wurden und eine Protektion gegen den myokardialen Reperfusionsschaden erreichen konnten, lässt erwarten, dass es möglich sein wird, über eine Intervention in der frühen Reperfusionsphase die langfristige Prognose für den Myokardinfarkt deutlich zu verbessern. Solche Interventionen werden als Reperfusionstherapie bezeichnet.

Zu den wichtigsten Ansätzen für die Protektion gegen den Reperfusionsschaden gehört die Beeinflussung der Ca^{2+} -Homöostase. Verschiedene Studien zeigen, dass die Hemmung der Ca^{2+} -Oszillationen oder die Reduzierung der Ca^{2+} -Sensibilität des kontraktiles Apparates die Infarktgröße an reperfundierten Herzen und die Hyperkontraktur an isolierten Kardiomyozyten signifikant reduzieren [Siegmond et al., 1991, 1997; Schäfer et al., 2001; Inserte et al., 2002; Abdallah et al., 2005, 2006].

In diesem Zusammenhang kommt der Ca^{2+} -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA) eine besondere Bedeutung zu. Die Aktivität der SERCA steigt durch die Phosphorylierung und damit Inaktivierung des Regulatorproteins Phospholamban. Dies führt zur schnellen Beseitigung der zytosolischen Ca^{2+} -Überladung und damit zur Reduktion der Ca^{2+} -Oszillationen. Ähnliche Wirkung auf die Ca^{2+} -Oszillationen hat die Blockade der Ryanodin-Rezeptoren des SR. Unter einer solchen Blockade kann das Ca^{2+} nicht aus dem SR freigesetzt werden, was die Entstehung der Ca^{2+} -Oszillationen verhindert.

In letzter Zeit wurde mehrfach gezeigt, dass die Aktivierung bestimmter zellulärer Signalkaskaden bei der Kardioprotektion gegen den Reprfusionsschaden eine besondere Rolle spielt. Die daran beteiligten Signalelemente bzw. Proteinkinasen werden als „Reperfusion Injury Salvage Kinases“ (RISK) bezeichnet [Hausenloy und Yellon, 2004, 2007; Bopassa et al., 2006; Gateau-Roesh et al., 2006]. Dazu gehören die Proteinkinase G (PKG), die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und die Glykogen-Synthase-Kinase-3 β (GSK-3 β).

Das Endziel der PKG und PI3K ist die SERCA, wo beide Kinasen Phospholamban phosphorylieren und die SERCA somit aktivieren. Zu den wichtigen Agonisten, die über die Stimulierung der Signalkaskade der PKG den Reperfusionsschaden reduzieren, gehören die NO-Donatoren [Schlüter et al., 1994; Agulló et al., 1999; Padilla et al., 2000]. Außerdem können Mitglieder der Natriuretischen Peptid-Familie durch PKG-Stimulierung protektiv wirken [Hempel et al., 1997; Padilla et al., 2001].

Über die Stimulierung der Signalkaskade der PI3K bewirken Insulin, Adenosin und Bradykinin eine Reduzierung des Reperfusionsschadens [Sack und Yellon, 2003; Park et al., 2006]. GSK-3 β unterscheidet sich von PKG und PI3K in diesem Kontext dadurch, dass bei GSK-3 β nicht die Stimulierung sondern die Hemmung kardioprotektiv wirkt.

Ein weiterer Ansatz für die Protektion gegen den Reperfusionsschaden besteht in der Hemmung der MPTP-Öffnung. Die pharmakologische Inhibierung der MPTP am Anfang der Reperfusion reduziert die Größe des Infarktgebietes am reperfundierten Myokard in vivo [Gomez et al., 2007; Bhamra et al., 2008]. Dieser Mechanismus der Kardioprotektion kann über die Stimulierung der PI3K-Signalkaskade und auch über die Hemmung der GSK-3 β eingeleitet werden.

Ein klinisch interessanter Ansatz der Reperfusionstherapie ist die sogenannte Postkonditionierung. Dies ist ein Manöver, bei dem die Reperfusion zunächst durch eine Folge kurzer Ischämieperioden unterbrochen wird. Dieses der ischämischen Präkonditionierung (kurze Ischämieperioden vor der Langzeitischämie) entlehnte Verfahren schützt das reperfundierte Myokard, wenn es gleich in der ersten Minute der Reperfusion begonnen wird. Im Gegensatz zur Präkonditionierung, die therapeutisch bedeutungslos geblieben ist, da sie vor einem Koronarverschluss appliziert werden müsste, ist die Postkonditionierung klinisch vielversprechend und wurde bereits in klinischen Studien angewandt [Staat et al., 2005; Thibault et al., 2008]. In diesem Zusammenhang wurden einzelne Signalmechanismen von RISK identifiziert, die an der durch Postkonditionierung induzierten Kardioprotektion beteiligt sind [Tsang et al., 2004; Bopassa et al., 2006].

Die Kontrolle des intrazellulären pH-Wertes im Sinne einer Verlangsamung der Reperfusion-induzierten Realkalisierung und Beibehaltung der Azidose in den ersten Minuten der Reperfusion ist ein weiterer wichtiger Mechanismus, der in der Lage ist, Kardiomyozyten gegen den Reperfusionsschaden zu schützen [Ladilov et al., 1995; Piper et al., 2004].

1.2 Glykogen-Synthase-Kinase-3 β und der Reperfusionsschaden

1.2.1 Glykogen-Synthase-Kinase-3 β

Die Glykogen-Synthase-Kinase-3 ist eine Serin/Threonin Proteinkinase, die in mehreren Signalwegen wie z.B. Insulinsynthese und Wnt-Signalweg eine zentrale Rolle spielt. Ursprünglich wurde die GSK-3 als eine Kinase entdeckt, die die Glykogen-Synthase phosphoryliert und inhibiert [Embi et al., 1980; Rylatt et al., 1980], weshalb diese Funktion auch Namensgeber des Enzyms wurde. Beim Menschen hat die GSK-3 zwei Isoformen, die als GSK-3 α (51 kDa) und GSK-3 β (47 kDa) bezeichnet werden [Harwood, 2001; Woodgett, 2001].

Die GSK-3 β ist eine sehr verbreitete Kinase, die außer im Zytosol auch in den Mitochondrien und im Zellkern lokalisiert ist [Bijur und Joep, 2003]. Sie phosphoryliert und reguliert eine große Anzahl von Substraten und ist so in eine Reihe zellulärer Funktionen involviert. Dazu gehören Metabolismus, Zellentwicklung, Gen-Transkription, Proteintranslation, Organisation des Zytoskeletts, Regulation des Zellzyklus und Apoptose [Grimes und Joep, 2001]. Außerdem kommt der GSK-3 β bei verschiedenen Erkrankungen, wie z.B. Tumorerkrankungen oder neurologischen Erkrankungen, eine Bedeutung zu [Imahori und Uchida, 1997; Miller et al., 1999; Kim und Kimmel, 2000].

Eine wichtige Eigenschaft der GSK-3 β ist die Tatsache, dass die GSK-3 β ihre Katalysatoraktivität auch in Abwesenheit stimulierender Faktoren in der Zelle beibehält. Es gibt zwei wichtige Mechanismen, über die die Aktivität der GSK-3 β reguliert werden kann. Beim ersten Mechanismus wird die Aktivität der GSK-3 β durch Phosphorylierung an Tyrosin 216 gesteigert [Hughes et al., 1993; Wang et al., 1994]. Der zweite Regulationsmechanismus der GSK-3 β und damit ihrer Substrate ist die Hemmung der GSK-3 β durch Phosphorylierung an Serin 9 [Sutherland et al., 1993; Stambolic und Woodgett, 1994; Cross et al., 1995].

Es gibt eine Reihe von Kinasen, die die GSK-3 β über diesen Mechanismus inaktivieren [Cohen und Frame, 2001]. Eine der wichtigsten unter diesen Kinasen ist die Proteinkinase B (PKB)/Akt. Da die PKB ein Downstream-Target der PI3K ist, führt eine Aktivierung der PI3K ebenfalls zu Inaktivierung der GSK-3 β [Tong et al., 2002]. Außerdem führt eine β -adrenerge Stimulation über eine Aktivierung der PKB/Akt zur Hemmung der GSK-3 β [Morisco et al., 2000]. Weitere Kinasen, die die GSK-3 β direkt oder indirekt inaktivieren, sind die Proteinkinase A [Fang et al., 2000], Integrin-linked

Kinase (ILK) [Delcommenne et al., 1998], p70 S6 Kinase, p90 ribosomale S6 Kinase [Cross et al., 1994] und bestimmte Formen der Proteinkinase C [Tsujio et al., 2000; Ballou et al., 2001].

1.2.2 Kardioprotektion durch die Hemmung der GSK-3 β

In den letzten Jahren sind viele Studien erschienen, die es sich zur Aufgabe gemacht haben, die Bedeutung der GSK-3 β bei verschiedenen kardialen Störungen wie Reperfusionsschaden und Myokardhypertrophie zu erforschen und die Frage zu beantworten, ob eine Hemmung der GSK-3 β kardioprotektiv wirken kann.

Aus diesen Studien gibt es Befunde, die der Hemmung der GSK-3 β kardioprotektive Wirkungen nachweisen. Dazu gehört die Nachahmung der kardioprotektiven Effekte der ischämischen Präkonditionierung [Tong et al., 2002], und die Reduzierung der mitochondrialen Permeabilitätstransition [Gomez et al., 2008] durch die Inhibierung der GSK-3 β . Ferner konnte gezeigt werden, dass die GSK-3 β -Hemmung die Infarktgröße an ischämisch-reperfundierten Rattenherzen signifikant reduziert [Park et al., 2006].

Trotz der vielfältigen Arbeiten auf diesem Gebiet bleiben viele Fragen offen. Die Auswirkung der GSK-3 β -Hemmung auf die zellulären Mechanismen, die unmittelbar zum Reperfusionsschaden führen, wie z.B. Ca²⁺-Homöostase und Hyperkontraktur sind unklar. Über die Mechanismen, über die eine GSK-3 β -Hemmung die oben beschriebenen kardioprotektiven Effekte bewirkt, ist wenig bekannt. Auch die Frage, ob und inwieweit eine GSK-3 β -Inhibierung die Reperfuion-induzierte Realkalisierung beeinflusst, ist von großer Bedeutung und Relevanz, wurde jedoch nicht beantwortet.

1.3 Ziele der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist zu untersuchen, ob eine Hemmung der Glykogen-Synthase-Kinase-3 β während der Reperfusion den myokardialen Reperfusionsschaden reduzieren kann. Außerdem soll analysiert werden, auf welche zellulären Mechanismen diese Protektion gegen den Reperfusionsschaden durch die GSK-3 β -Hemmung zurückzuführen ist.

Am Modell isolierter Kardiomyozyten wurde untersucht, ob die Applikation von Inhibitoren der GSK-3 β während der Reperfusion Einfluss hat auf:

- 1) das Ausmaß der Hyperkontraktur,
- 2) die Entwicklung der Nekrose,
- 3) die zytosolische Ca²⁺-Homöostase,
- 4) die Öffnung der mitochondrialen Permeabilität-Transition-Poren,
- 5) das mitochondriale Membranpotential und
- 6) den zytosolischen pH-Wert.

2 MATERIAL

2.1 Chemikalien

Vielfach verwendete Chemikalien

Albumin(aus Rinderserum)	Roche Applied Science,Mannheim
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
2-Deoxy-D-Glukose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol	Riedel de Haën, Seelze
Glukose	Merck, Darmstadt
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumcyanid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka, Schweiz
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt
Kollagenase, Typ CLS II,(322U/mg)	Biochrom KG, Berlin
Laminin	Roche Applied Science,Mannheim
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Medium 199	Biochrom, Berlin
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Gibco BRL, Eggenstein

Perfusionsexperimente

BCECF (2',7'-bis-(2 caboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein)	Invitrogen, Karlsruhe
bisBenzimide	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Calcein-AM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fura-2-AM, (1-(2-(5-Carboxyoxazol-2-yl)-6-aminobenzofuran-5-oxy)-2-(2'-amino-5'methylphenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraacetat	Invitrogen, Karlsruhe
JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-Tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide)	Invitrogen,Karlsruhe
N ₂	Linde, München
Nigericin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Inhibitoren

Cyclosporin A	Merck, Darmstadt
GSK-3 β -Inhibitor XI, (3-(1-(3-Hydroxypropyl)-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-3-yl)-4-pyrazin-2-yl-pyrrole-2,5-dione)	Merck, Darmstadt
Lithiumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SB216763 (3-(2,4-Dichlorophenyl)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Gelelektrophorese

Acrylamid	Carl Roth, Karlsruhe
Benzonase®	Merck, Darmstadt
Bisacrylamid	Carl Roth, Karlsruhe
APS	Serva, Heidelberg
BSA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ECL-Entwicklerlösung (=SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate)	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
EDTA-Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EGTA	Merck, Darmstadt
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Fluka, Schweiz
Natriumfluorid	Merck, Darmstadt
Natriummonovanadat	Merck, Darmstadt
Ponceau S solution	Serva, Heidelberg
Proteasehemmer Tablette	Roche Applied Science, Mannheim
SDS	Merck, Darmstadt
TEMED	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris	Merck, Darmstadt
Trypsin-EDTA-Lösung	Biochrom AG, Berlin
Tween 20	Amersham, Braunschweig

Radioaktivitätsmessung

GSK-3 β -Aktivitäts-Assay-Kit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bestandteile des Kits:	
Assay-Puffer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EZview™ Red Protein G Affinity Gel	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
GSK-3 Inhibitor-Lösung (SB 415286)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
GSK-3 β Peptid-Substrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Monoklonaler Anti-GSK-3 β Antikörper	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
P81 Zellulose-Phosphat-Vierecke	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Wasch-Puffer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Andere Chemikalien:	
γ - ³² P-ATP	PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim
Azeton	Carl Roth, Karlsruhe
Phosphorsäure	Carl Roth, Karlsruhe

Antikörper

Anti-Kaninchen-IgG (HRP-gekoppelt)	Amersham Biosciences, Freiburg
Anti-Maus-IgG (HRP-gekoppelt)	Amersham Biosciences, Freiburg
Anti-Ziege-IgG (HRP-gekoppelt)	Dianova, Hamburg
Anti-GSK-3 β , pAK, Kaninchen IgG	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-GSK-3 β ~P Tyr 216, pAk, Ziege IgG	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-GSK-3 β ~P Ser 9, pAk, Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti-Vinculin, mAk, Maus IgG (hVIN-1)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Alle übrigen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roche Applied Science (Mannheim) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen und waren von höchster erhältlichlicher Qualität. Die Substanzen wurden nach Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt.

2.2 Häufig verwendete Medien und Puffer

2.2.1 Zellkulturmedien

<u>CCT-Medium:</u>	Medium 199 +	
	HEPES	3,6 g/l
	Kreatin	5 mM
	Karnitin	2 mM
	Taurin	5 mM

Das CCT-Medium wurde mit NaOH auf pH 7,4 titriert.

Zusammensetzung des Vorplattierungsmediums:

CCT-Medium +	
Laminin	0,5 µg/ml
Penicillin	100 IU/ml
Streptomycin	10 µg/ml

Zusammensetzung des Ausplattierungsmediums:

CCT-Medium +	
Penicillin	100 IU/ml
Streptomycin	10 µg/ml

Alle Medien wurden sterilisiert und bei 4°C aufbewahrt.

2.2.2 Perfusionsmedien

Die in unseren Anoxie-Reoxygenation-Experimenten verwendeten Perfusionsmedien werden im Folgenden beschrieben.

Normoxische HEPES-gepufferte Tyrode-Lösung (Normoxiemedium):

Substanz	Konzentration in mM
NaCl	125,0
KCl	2,6
KH ₂ PO ₄	1,2
MgSO ₄	1,2
CaCl ₂	1,0
HEPES	25,0
Glukose	2,5

Die Lösung wurde bei 37°C mit NaOH auf pH 7,4 titriert.

Anoxische HEPES-gepufferte Tyrode-Lösung (Anoxiemedium):

Substanz	Konzentration in mM
NaCl	125,0
KCl	2,6
KH ₂ PO ₄	1,2
MgSO ₄	1,2
CaCl ₂	1,0
HEPES	25,0

Die Lösung wurde bei 37°C mit NaOH auf pH 6,4 titriert.

Das Anoxiemedium wurde nach der von Allshire et al. [Allshire et al., 1987] beschriebenen Methode in dampfdruckfesten Gefäßen für 60 Minuten bei zwei bar und 120°C in einem Dampfdruckkochtopf gekocht.

2.2.3 Inkubationsmedien

Vor Durchführung der Gelelektrophoresen und der Radioaktivitäts-Messungen wurden die Zellkulturschalen vor der Gewinnung der Zelllysate mit folgenden zwei Medien vorbehandelt:

Normoxisches Inkubationsmedium:

Hier wurde die in den Anoxie-Reoxygenation-Experimenten verwendete normoxische HEPES-gepufferte Tyrode-Lösung verwendet.

Das normoxische Inkubationsmedium wurde sowohl für die simulierte Normoxie als auch für die simulierte Reoxygenation (nach vorangegangener simulierter Anoxie mit dem anoxischen Inkubationsmedium) verwendet.

Anoxisches Inkubationsmedium:

50 ml der anoxischen HEPES-gepufferten Tyrode-Lösung

2-Deoxy-D-Glukose	10 mM
-------------------	-------

Kaliumcyanid	5 mM
--------------	------

2.3 Geräte und Laborbedarf

Zellkultur und Herzmuskelzellisolierung

Brutschrank

Deckgläser

Gewebehacker

Langendorff-Apparatur

Mikroskop

Nylonnetz

Präparationsbesteck

Sterilbank

Kendro, Hanau

Menzel, Braunschweig

Harvard Apparatus

über Hugos Sachs Elektronik,

March-Hugstetten

Eigenbau, Physiologisches

Instituts, JLU Giessen

TMS-F, Nikon, Japan

NeoLab, Heidelberg

Eickenmeyer, Tuttlingen

Kendro, Hanau

Fluoreszenzmessungen

CCD Kamera

Computer-Software

Dichroid-Spiegel

Emissionsfilter

Inverses Mikroskop

Monochromator

Xenon-Lampe

TILL Photonics, Gräfelfing

TILL Photonics, Gräfelfing

Olympus, Hamburg

Olympus, Hamburg

Olympus, Hamburg

TILL Photonics, Gräfelfing

TILL Photonics, Gräfelfing

Anoxie-Reoxygenation-Experimente

Dampfdruckkochtopf

Druckstabile Glasgefäße mit
verschliessbarem Deckel

Edelstahlkapillaren

Gasdichte Schläuche

Gasventile

Peristaltikpumpe

Perfusionskammer

All American, Canada

Bormioli Rocco, Italien

Alltech, Unterhaching

Kahlensee, Gießen

Kahlensee, Gießen

Gilson-Abimed, Langenfeld

Eigenbau, Physiologisches

Institut, JLU Giessen

Gelelektrophorese

CCD Kamera für Westernblot Analysen	Bio Rad, Hercules, USA
Elektrophoresekammern	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Elektroblotkammern	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Netzgeräte, Typ: High Voltage Power Pack P30	Biometra, Göttingen
Typ: EPS 3501 XL	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Radioaktivitätsmessung

β-Counter (1600 TR, Liquid Scintillation Analyzer)	Canbara Packard, Frankfurt
Counter-Fläschchen	Pachard, Groningen, Niederlande

Weitere Geräte

Glasgeräte	Schott, Mainz
Hamiltonspritze (100 µl)	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Heizblock	Techne, Burkhardtsdorf
Heizrührer	Jahnke & Kunkel, Staufen
Inkubator	Kendro, Hanau
Pestler	Kontes, Vineland, USA
Perfusionsheizung	Eigenbau, Physiologisches Institut, JLU Giessen
Pipetten	Eppendorf-Nethler-Hinz, Hamburg
pH-Meter	WTW, Weinheim
Schüttler, Typ: WT 12	Biometra, Göttingen
Vortexer	IKA-Werke, Staufen
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Wasserdemineralisierungsanlage	Millipore, Eschborn
Zentrifugen	Haraeus, Hanau

Verbrauchsmaterialien

Kulturschalen, Typ Falcon 3001

Nitrozellulosemembran

Parafilm®

Pellet Pestle®

Pipettenspitzen

Reaktionsgefäße (1,5 ml)

Reaktionsgefäße (0,5 ml; 2 ml)

Röhrchen, 10 ml

Röhrchen, 50 ml, Typ: Falcon: 352070

Trockenpapier

Zellkulturschalen, Typ: Falcon 353001

Zellschaber, Typ: Falcon 353087

Becton Dickinson, Heidelberg

Schleicher und Schuell, Dassel

PECHINEY Plastic Packaging,

Menasha, USA

Kontes, Vineland, USA

Eppendorf-Nethler-Hinz,

Hamburg

Sarstedt, Nümbrecht

Eppendorf-Netheler-Hinz,

Hamburg

Greiner Labortechnik GmbH,

Frickenhausen

Becton Dickinson, Heidelberg

Biotec-Fischer, Reiskirchen

Becton Dickinson, Heidelberg

Becton Dickinson, Heidelberg

3 METHODEN

3.1 Herzmuskelzellisolierung und Zellkultur

3.1.1 Versuchstiere

In unserem Modell wurden ventrikuläre Herzmuskelzellen adulter männlicher Wistar Ratten verwendet. Die Tiere wurden im Tierstall des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität Giessen gezüchtet und hatten freien Zugang zu Nahrung (ALTROMIN) und Wasser. Die Tiere waren zu Zeitpunkt der Präparation 200-300 g schwer.

3.1.2 Herzmuskelzellpräparation

Die Herzmuskelzellen wurden nach der von Piper et al. [Piper et al., 1982] beschriebenen Methode isoliert.

Als Lösungen wurden verwendet:

Ca²⁺-Stammlösung:

Substanz	Konzentration in mM
CaCl ₂	100,0

Powell-Medium:

Substanz	Konzentration in mM
NaCl	110,0
NaHCO ₃	25,0
KCl	2,6
KH ₂ PO ₄	1,2
MgSO ₄	1,2
Glukose	11,0

Kollagenasepuffer:

Substanz	Menge
Powell-Medium	50 ml
Kollagenase	20 mg
Ca ²⁺ - Stammlösung	12,5 µl

Unter Ethernarkose wurde das Leben der Tiere durch Genickbruch beendet. Nach Öffnung des Brustraumes wurde das Perikard entfernt, Herz und Lunge angehoben, durch Scherenschlag vom Tierkörper getrennt und sofort in eiskalte isotonische NaCl-Lösung gelegt. Hier wurde das Herz von Geweberesten freipräpariert und anschließend mit der Aorta ascendens an eine Langendorff-Apparatur angeschlossen. Um das in den Koronarien verbliebene Blut auszuwaschen wurde das Herz für kurze Zeit mit Powell-Medium retrograd perfundiert. Anschließend wurde es bei einer Flussrate von 2-3 ml/min rezirkulierend mit Kollagenasepuffer perfundiert. Dann wurden die Ventrikel von den Vorhöfen abgeschnitten und das Ventrikelgewebe, erst mechanisch mit einem Gewebehacker, anschließend mit zwei Skalpellen manuell zerkleinert. Danach wurde das zerkleinerte Gewebe für fünf Minuten in Kollagenasepuffer (37°C) inkubiert. Die Mazeration der Kardiomyozyten wurde durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mit einer 5 ml Pipette unterstützt. Um restliche Zellaggregate zu entfernen wurde die Suspension durch ein Nylonnetz (0,2 mm Porengröße) gefiltert. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 25×g für drei Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde nach Aufnahme in Powell-Medium (mit 200 µM CaCl₂) ein zweites Mal bei 25×g für zwei Minuten zentrifugiert. Dann wurde das Pellet in Powell-Medium, das 400 µM CaCl₂ enthielt aufgenommen und durch Aufschütteln resuspendiert. Diese Suspension wurde entsprechend der Anzahl der präparierten Herzen auf Reagenzgläser verteilt, die zuvor mit einer ca. 10 ml hohen Flüssigkeitssäule aus Powell-Medium beschickt worden waren. Nach erneuter Zentrifugation (25×g für eine Minute) erhielt man eine Zellpopulation, die zu ca. 70 % aus stäbchenförmigen, lebenden Kardiomyozyten bestand.

3.1.3 Zellkultur

Um ein besseres Anheften der Kardiomyozyten an den Glasdeckgläschen zu gewährleisten, wurden die Kulturschalen (mit den innen liegenden Deckgläschen) mit Vorplattierungsmedium beschickt und über Nacht im Brutschrank bewahrt. Dieses Vorplattierungsmedium wurde am nächsten Tag unmittelbar vor dem Ausplattieren abgesaugt. Anschließend wurde das zuletzt gewonnene Pellet vorsichtig ins Ausplattierungsmedium aufgenommen (24 ml pro Herz) und auf die vorplattierten Schalen verteilt. Nach einer zweistündigen Anheftungsphase (37°C) wurde das Ausplattierungsmedium gewechselt, wobei abgerundete, tote Zellen entfernt wurden, sodass die letztendliche Kultur zu ca. 90% aus stäbchenförmigen lebenden Kardiomyozyten bestand. Die Glasdeckgläschen mit den darauf anhaftenden Kardiomyozyten konnten dann unmittelbar für unsere Anoxie-Reoxygenation-Experimente genutzt werden.

Für die Gelelektrophorese und die Radioaktivitätsmessung wurden keine Glasdeckgläschen verwendet. Hier wurden die Kulturschalen mit dem Vorplattierungsmedium beschickt und über Nacht im Brutschrank bewahrt. Das Ausplattieren und die darauf folgende Anheftungsphase erfolgten nach derselben im oberen Paragraph beschriebenen Methode. Anschließend konnten die Kulturschalen für Gelelektrophorese oder Radioaktivitätsmessung genutzt werden.

3.2 Anoxie-Reoxygenation-Experimente

3.2.1 Versuchsaufbau

Für die Anoxie-Reoxygenation-Experimente wurden die Glasdeckgläschen mit den darauf haftenden Kardiomyozyten in eine Perfusionskammer eingebaut, die anschließend gasdicht verschlossen wurde. Mittels einer Peristaltikpumpe wurden die Perfusionsmedien durch Edelstahlkapillaren mit einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/min durch die Perfusionskammer gepumpt. Während des ganzen Versuchs wurde das Anoxiemedium mit 100 % N₂ begast und das System war insgesamt gasdicht. Die Temperatur in der Perfusionskammer betrug 37°C.

3.2.2 Video-Imaging-System für fluoreszenzmikroskopische Messungen

Die Messung verschiedener intrazellulärer Parameter wurde auf der Basis der Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Aus dem von einer Xenon-Lampe generierten Licht wird mit Hilfe eines Monochromators die passende Wellenlänge ausgewählt und mittels eines dichroidischen Spiegels auf die mit Fluoreszenzfarbstoff beladenen Kardiomyozyten in die Perfusionskammer gelenkt. Das von den Zellen emittierte Fluoreszenzlicht gelangt durch denselben dichroidischen Spiegel und einen Emissionsfilter zu einer Kamera, die an ein Computersystem angeschlossen ist. Die Daten der fluoreszenzmikroskopischen Messungen wurden mithilfe einer TILL Photonics-Software (TillVision) ausgewertet.

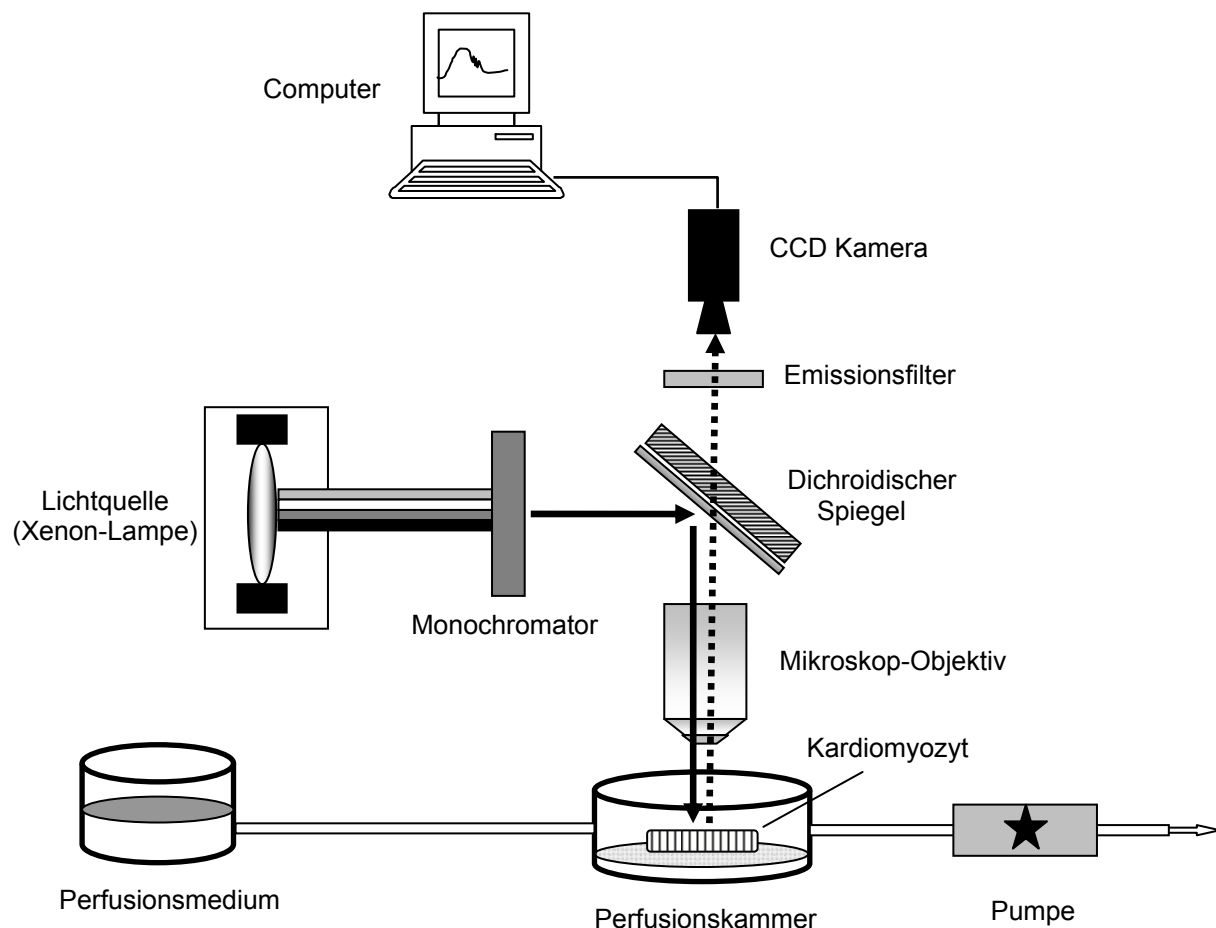


Abb. 3.1 Vereinfachte schematische Darstellung der Video-Imaging-Mikroskopie. Durchgezogene Linie: Anregungslicht. Gepunktete Linie: Von den Fluoreszenzfarbstoff-beladenen Kardiomyozyten emittiertes Licht.

3.2.3 Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration

Die Messung der Ca^{2+} -Konzentration beruht auf Fluoreszenzmikroskopie. Die Kardiomyozyten wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2-AM (2,5 μM) in CCT-Medium beladen und 30 min lang bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen mit CCT-Medium gewaschen und für weitere 15 min nachinkubiert. Fura-2-AM ist ein Acetoxymethylester, der in die Zellen eindringt, dort von intrazellulären Esterasen gespalten wird und dann, als geladenes Molekül, nicht mehr die Zellmembran permeieren kann. Die Anregung von Fura-2-AM erfolgt mit den Wellenlängen 340 und 380 nm, das Emissionsmaximum liegt bei 510 nm. Die Daten der Fura-2-Messungen werden als Ratio (340 nm/380 nm) in relativen Einheiten (r.E.) wiedergegeben.

3.2.4 Detektion der MPTP-Öffnung mit der Calcein-Cobalt-Methode

Calcein-AM ist ein Acetoxymethylester, der in die Zellen eindringt und sich bevorzugt in den Mitochondrien lagert. Intrazellulär wird es von Esterasen gespalten und kann so weder die Mitochondrien- noch die Zellmembran durchdringen. Für die Anoxie-Reoxygenation-Versuche wurden die Zellen für 30 min bei 37°C mit Calcein-AM (2,5 μM) beladen. Um das zytosolische Kompartiment des Calceins zu löschen, wurden die Zellen mit CoCl_2 (200 μM) für 15 Minuten nachinkubiert. Cobalt bleibt im Zytosol und löscht dort das zytosolische Calcein-Signal. Mit dieser Prozedur wird eine ausschließliche mitochondriale Kompartimentierung von Calcein erreicht. Erst wenn die MPTP sich öffnen und folglich die mitochondriale Membran für Moleküle bis 1,5 kDa permeabel wird kann das 1,2 kDa große Calcein die Mitochondrien verlassen. Sobald sich die MPTP öffnen dringt das Calcein ins Zytosol und wird sofort vom dortigen Cobalt gelöscht. Der so entstandene Abfall der Calceinfluoreszenz zeigt die MPTP-Öffnung. Der Fluoreszenzfarbstoff Calcein wird mit der Wellenlänge 480 nm angeregt, wobei das Emissionsmaximum bei 530 nm liegt.

3.2.5 Messung des mitochondrialen Membranpotentials mit JC-1

Um das mitochondriale Membranpotential ($\Delta\Psi$) zu messen wurden die Kardiomyozyten vor der Durchführung der Anoxie-Reoxygenation-Versuche für 20 Minuten mit JC-1 (5 μM) bei 37°C beladen und anschließend mit CCT-Medium gewaschen und für 15 Minuten nachinkubiert.

JC-1 ist ein zellpermeabler Fluoreszenzfarbstoff, der die Mitochondrien lebender Zellen abhängig vom mitochondrialen Membranpotential anfärbt. Er existiert in zwei verschiedenen Zustandsformen: als Monomer und als Aggregat. Die Monomere treten bevorzugt bei niedrigem Membranpotential auf und fluoreszieren grün. Bei höherem mitochondrialen Membranpotential aggregieren die Monomere zu sogenannten J-Aggregaten, die rot fluoreszieren. Dies verursacht eine Veränderung in den Absorptions- und Fluoreszenzspektren. Beide Formen können simultan gemessen werden. Entsprechend der Änderungen im Membranpotential, kann unter dem Fluoreszenzmikroskop ein Farbwechsel zwischen rot und grün beobachtet werden. Hierbei zeigen JC-1-Monomere die grünliche (Emissionsmaximum 530 nm), J-Aggregate die rötliche Fluoreszenz (Emissionsmaximum 580 nm).

3.2.6 Messung des intrazellulären pH-Wertes

Zur Ermittlung des intrazellulären pH-Wertes wurden die Kardiomyozyten für 15 Minuten bei 37°C mit dem Fluoreszenzindikator BCECF-AM (1,25 μM) inkubiert. BCECF gelangt als Acetoxymethylester in die Zellen und wird dort, aufgrund von Esterspaltung durch intrazelluläre Esterasen, in die geladene, zellimpermeable Form überführt. Nach der Beladung wurden die Zellen mit CCT-Medium gewaschen und für 15 Minuten nachinkubiert. Der Farbstoff BCECF wird mit der Wellenlänge 440 nm angeregt. Das Emissionsmaximum liegt zwischen 520 und 560 nm. Änderungen des pH-Wertes wurden als Änderungen des gemessenen BCECF-Signals in % wiedergegeben. Die initialen normoxischen Werte am Anfang der Versuche wurden auf 100 % gesetzt.

Die Kalibrierung wurde mit zwei Medien durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen in Perfusionsversuchen mit einem Medium von pH=7,2 perfundiert. Um den intrazellulären pH-Wert dem extrazellulären Wert anzugleichen, wurde das Protonophor Nigericin (10 μM) appliziert. Das unter dieser Bedingung gemessene BCECF-Signal entspricht dem pH-Wert 7,2. Anschließend wurden die

Kardiomyozyten mit einem Medium von pH=6,4 perfundiert. Nach Applikation von Nigericin und Angleichung der pH-Werte intra- und extrazellulär wurde das nun gemessene BCECF-Signal als ein pH-Wert von 6,4 betrachtet.

3.2.7 Testen der Funktion des Na^+/H^+ -Austauschers

Um die Funktion des Na^+/H^+ -Austauschers zu analysieren, wurde die Ammoniumpuls-Methode angewandt. Hier wurde nach einer normoxischen Perfusion Ammoniumchlorid (NH_4Cl) in einer Konzentration von 10 mM schnell eingewaschen. Ammonium (NH_4^+) liegt bei pH 7,4 zu einem Teil als zellpermeables NH_3 vor. Folge des pulsatilen Einwaschens mit NH_4Cl ist eine zelluläre Alkalose, die beim Auswaschen des Ammoniums in eine Azidose umgekehrt wird [Roos und Boron, 1981] (Abb. 3.2).

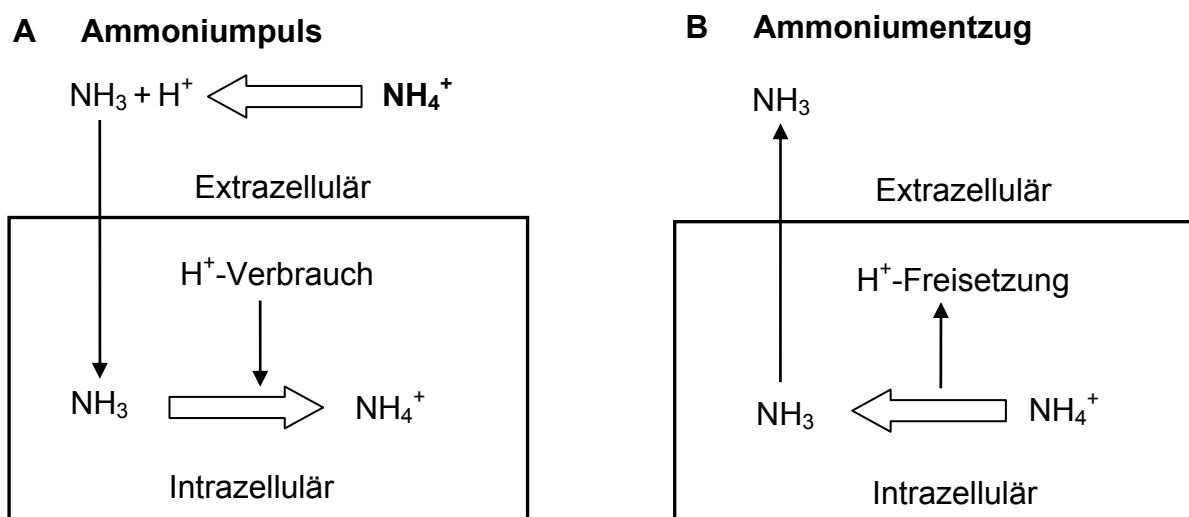


Abb. 3.2 Ammoniumpuls-Methode

A. Einwaschen von Ammonium: Das zellpermeable NH_3 , das im pH-abhängigen Gleichgewicht mit NH_4^+ steht, diffundiert entlang seinem Konzentrationsgradienten in die Zelle, bindet dort Protonen und alkalisiert den Intrazellulärraum.

B. Auswaschen des Ammoniums: Der Ammoniumentzug führt zu einem Ausstrom von NH_3 aus der Zelle. Das intrazellulär zurückgebliebene NH_4^+ wird unter Freisetzung von H^+ in NH_3 verwandelt. Dies führt zur intrazellulären Azidose, die mit Hilfe des Na^+/H^+ -Austauschers beseitigt wird, so dass sich der ursprüngliche pH-Wert wieder einstellt.

3.2.8 Nekrosedetektion

Am Ende der Anoxie-Reoxygenation-Versuche wurden die Kardiomyozyten mit den Farbstoffen bisBenzimide (10,6 μM) und Propidiumiodid (37,5 μM) für 15 Minuten gefärbt. Die Zellmembranen lebender Zellen sind für Propidiumiodid undurchlässig. Es dringt ausschließlich in nekrotische Zellen ein und färbt so die Zellen und ihre Zellkerne.

Bei Anregung mit der Wellenlänge 360 nm zeigen sich die nekrotischen Zellen mikroskopisch als rote Zellen mit dunkelroten Zellkernen, manchmal auch ohne Zellkerne. Die apoptotischen Zellen zeigen sich blau mit runden dunkelblauen Zellkernen. Die lebenden Zellen sind als stäbchenförmige blaue Zellen mit länglichen Kernen zu sehen. Alternativ kann mit der Wellenlänge 530 nm angeregt werden. Hier sieht man unter dem Mikroskop nur die dunkelroten nekrotischen Zellen.

3.2.9 Experimentelles Protokoll

Zur Simulation von Ischämie und Reperfusion wurden die Kardiomyozyten für 60 Minuten mit Anoxiemedium und anschließend für 25 Minuten mit Reoxygenationsmedium perfundiert. In den entsprechenden Experimenten wurden während der gesamten Reoxygenation verschiedene Inhibitoren einzeln oder in Kombination appliziert. Die folgende Tabelle beschreibt diese Inhibitoren, die in den Anoxie-Reoxygenation-Experimenten eingesetzt wurden.

Substanz	Konzentration	Eigenschaften
SB216763	6 μM	Hemmt GSK-3 β , Konkurrent um die ATP-Bindungsdomäne
LiCl	1 mM	Hemmt GSK-3 β , Antagonist an der Mg^{2+} -Bindungsdomäne
GSK-3 β -Inhibitor XI	300 nM	Hemmt GSK-3 β , Konkurrent um die ATP-Bindungsdomäne
Cyclosporin A	500 nM	Hemmt MPTP, Cyclophilin D-Inhibitor

3.2.10 Messparameter

Die folgenden Parameter wurden in den Anoxie-Reoxygenation-Experimenten bestimmt.

Parameter	Methode	Einheit
Zelllänge	Zelllängenmessung	% der endanoxischen Länge
Zytosolisches Ca^{2+}	Fura-2	Relative Einheiten
Ca^{2+} -Oszillationen	Fura-2	Anzahl der Oszillationen / min
Nekrose	Propidiumiodidfärbung	% aller gezählten Zellen
MPTP-Öffnung	Calcein-Cobalt	Absolute Counts oder in %
Mitochondriales $\Delta\Psi$	JC-1	Fluoreszenz-Ratio oder in %
pH	BCECF	Absolute Counts oder in %

3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der SDS-PAGE (Sodium-Dodecylsulfate-Polyacrylamid-Gel-Electrophoresis) können Proteine nach ihrer relativen Größe im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Mit Hilfe dieses Verfahrens wurde sowohl der Proteingehalt als auch der Phosphorylierungsstatus der Glykogen-Synthase-Kinase-3 β untersucht.

3.3.1 Vorbehandlung der Kardiomyozyten

Die Kulturschalen mit den Kardiomyozyten wurden mit den Inkubationsmedien nach folgenden fünf Bedingungen vorbehandelt:

1. Normoxie:

Normoxische Inkubation 60 Min

2. Anoxie:

Anoxische Inkubation 60 Min

3. Reoxygenation:

Anoxische Inkubation 60 Min

Reoxygenation 20 Min

4. Reoxygenation mit SB:

|-----SB216763-----|

Anoxische Inkubation 60 Min

Reoxygenation 20 Min

3.3.2 Probenvorbereitung und Proteinmengenbestimmung

Nach oben beschriebener Vorbehandlung wurden die Schalen auf Eis gelegt, das Inkubationsmediums abgesaugt und die Zellen mit 150 μ l eiskaltem Lysis-Puffer und 10 μ l (50 U/ml) Benzonase lysiert. Nun wurden die Zellen mittels eines Einmalschabers von der Kulturschale abgeschabt, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 30 Minuten in Eis gesteckt. Anschließend wurden die Proben mit einem Pestler homogenisiert und bei 8000 \times g und 4°C für zwei Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dann in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt [Bradford, 1976]. Dafür wurde mit Rinderserumalbumin eine Standardreihe der Konzentration 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 und 1

mg/ml vorbereitet. Von den Standards und Proben (Überstand) wurden je 20 µl auf eine 200 µl Bradford-Reagenz gegeben. Die dabei entstehende Farbänderung wurde im Spektrophotometer bei 595 nm gemessen. Die Proteinkonzentrationen ergaben sich durch rechnerischen Vergleich der optischen Dichte der Proben mit der Eichkurve.

Vor der Durchführung der Gelelektrophorese wurden von jeder Probe eine ca. 10 µg Protein enthaltende Menge auf 25 µl Laemmli-Puffer gegeben. Nachdem diese Proben auf 95°C zwei Minuten lang erhitzt wurden, standen sie für die Gelelektrophorese zur Verfügung.

Lysis-Puffer:

EDTA	1 mM
EGTA	1 mM
NaCl	150 mM
Natriummonovanadat	1 mM
Natriumfluorid	20 mM
SDS	0,1 %
Tris/HCl (pH 6,8)	50 mM
Roche Proteasehemmer Tablette (1 Tablette / 10 ml)	

2x Laemmli-Puffer:

Bromphenolblau (wt/vol)	0,01 %
β-Mercaptoethanol (vol/vol)	1 %
Glycerin (vol/vol)	25 %
SDS 10% (wt/vol)	4 %
Tris/HCl (pH 6,8)	0,5 M

3.3.3 Durchführung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Das anionische Detergens SDS bindet an Proteine und überdeckt dadurch deren Eigenladung. Durch die Erhitzung der Proben werden die Proteine denaturiert, die Zugabe von Merkaptoethanol und DTT bricht zudem Disulfidbrücken. Die SDS-Protein-Komplexe verschiedener Proteine unterscheiden sich dadurch nur noch in ihrer Größe voneinander. Nun werden die negativ geladenen Proteine bei ihrer Wanderung im elektrischen Feld durch ein Polyacrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) wurde mittels eines modifizierten, diskontinuierlichen Verfahrens nach Laemmli [Laemmli, 1970] durchgeführt. Zunächst wurden die zum Aufbau der Gelkammer benötigten Materialien gründlich gereinigt und mit 70%igem Ethanol entfettet. Das Gel wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen. Hierfür wurde der Spalt zwischen den Platten auf jeder Seite durch einen Spacer begrenzt. Nach unten wurde der Spalt mit einem Gummischlauch abgedichtet. Dieser Schlauch wurde mit Zug auch entlang der Spacer gespannt, so dass der Spalt rundherum abgedichtet wurde. Zuletzt wurden die Platten mit Klammern an der Gelkammer befestigt. Nun konnte das Trenngel bis auf zwei Drittel der Spalthöhe gegossen und mit Wasser (1 ml Aqua bidest.) überschichtet werden. Nach drei Stunden war das Trenngel vollständig polymerisiert und man konnte das Wasser entfernen und das Sammelgel obenauf gießen. Anschließend wurde der Gelkamm zur Formung der Taschen eingesetzt. Nach einer weiteren Stunde war das Sammelgel polymerisiert. Nun konnten der Gummischlauch und der Gelkamm entfernt werden. Die Gelkammer wurde dann in eine dazugehörige Wanne mit Laufpuffer gestellt. Anschließend wurde die Gelkammer auch oben mit Laufpuffer befüllt, sodass die Gele oben und unten mit Laufpuffer bedeckt waren. Nachdem die Taschen mit dem Laufpuffer ausgespült und alle Luftblasen entfernt wurden, konnten die Gele mit den Proben beladen werden. Es wurden 10%ige Gele im Verhältnis Acrylamid/Bisacrylamid 30/1 verwendet.

Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde ein Prestained Protein-Marker verwendet. Die SDS-Gelelektrophorese wurde entweder bei einer konstanten elektrischen Spannung von 50 Volt über Nacht oder bei einer elektrischen Spannung von 200 Volt für fünf Stunden durchgeführt. Der Lauf wurde zumeist kurz nach dem Auslaufen der Bromphenol-Lauffront gestoppt.

Trenngelpuffer (pH 8,8):

Tris/HCl	1,5 M
----------	-------

Trenngel (10,0 %):

AA/Bis AA (30/1); 30% (wt/vol)	13,6 ml
Aqua bidest.	13,8 ml
APS 10 % (wt/vol)	400 µl
SDS 10% (wt/vol)	400 µl
TEMED	30 µl
Trenngelpuffer	9,5 ml

Sammelgelpuffer (pH 6,8):

Tris/HCl	0,5 M
----------	-------

Sammelgel 6 %:

AA/Bis AA (30/1); 30 % (wt/vol)	4 ml
Aqua bidest.	10,4 ml
APS 10 % (wt/vol)	250 µl
Sammelgelpuffer	5 ml
SDS 10 % (wt/vol)	200 µl
TEMED	25 µl

Die Angaben beziehen sich auf die für zwei Gele benötigte Menge.

Laufpuffer:

Glycin	192 mM
SDS	3,5 mM
Tris/HCl	24,8 mM

3.3.4 Western-Blot

Die in den Polyacrylamidgelen aufgetrennten Proteine wurden im Semi-Dry-Verfahren elektrophoretisch nach Kyhse-Andersen [Kyhse-Andersen, 1984] auf Nitrozellulose-Membranen transferiert. Dazu wurden pro Gel fünf Filterpapiere und eine Nitrozellulose-Membran in einer dem Gel entsprechenden Größe zugeschnitten. Folgender Puffer wurde für das Western-Blot-Verfahren verwendet:

Blotpuffer (pH 8,3):

Glycin	150 mM
Methanol	10 % (vol/vol)
Tris/HCl	25 mM

Die Filterpapiere und die Nitrozellulose-Membran wurden separat 30 Minuten lang mit dem Blotpuffer getränkt. Zunächst wurden drei getränkte Filterpapiere luftblasenfrei auf die angefeuchtete Anode gelegt. Auf diese kam dann die Nitrozellulose-Membran, auf welche das Polyacrylamid-Gel nach Entfernung des Sammelgels aufgelegt wurde. Zwei weitere getränkte Filterpapiere und die feuchte Kathode der Blotkammer schlossen den Aufbau ab. Der Proteintransfer erfolgte bei konstanter Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ für zwei Stunden bei Raumtemperatur.

3.3.5 Reversible Proteinfärbung mit Ponceau S

Zur Kontrolle des vollständigen Proteintransfers auf die Nitrozellulose-Membran wurde eine reversible Färbung mit Ponceau S durchgeführt. Dafür wurden die Membranen kurz in Ponceau S geschwenkt, wodurch die transferierten Proteine unspezifisch rot gefärbt wurden. Durch Schwenken in Aqua bidest. wurde der Membranhintergrund anschließend so weit entfärbt, dass die Proteinbanden gut sichtbar wurden und dokumentiert werden konnten. Die Färbung konnte anschließend durch Waschen in TBS-Puffer (3 x 10 min) wieder vollständig entfernt werden.

1 x TBS-Puffer (pH 7,4):

NaCl	150 mM
Tris/HCl	10 mM
Tween (vol/vol)	0,1 %

3.3.6 Immunologischer Nachweis

Nach erfolgtem Proteintransfer konnten die zu untersuchenden Proteine mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Hierzu wurden die Membranen zunächst 60 Minuten in 4 % (wt/vol) BSA in TBS-Puffer bei Raumtemperatur inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen abzusättigen. Nach Waschen in TBS-Puffer (3 x 10 min) wurden die Membranen in 20 ml des jeweiligen Primärantikörpers in der vorgeschriebenen Konzentration in 4 % (wt/vol) BSA in TBS-Puffer für zwölf Stunden bei 4°C inkubiert.

Folgende Primärantikörper wurden verwendet:

Anti-GSK-3β	1:1000 in 4 % (wt/vol) BSA/TBS
Anti-GSK-3β~P Ser 9	1:1000 in 4 % (wt/vol) BSA/TBS
Anti-GSK-3β~P Tyr 216	1:1000 in 4 % (wt/vol) BSA/TBS
Anti-Vinculin	1:1000 in 4 % (wt/vol) BSA/TBS

Nach der Inkubation wurden die Membranen dreimal für zehn Minuten in TBS-Puffer gewaschen. Um die Antigen-Antikörperbindung zu detektieren, wurden die Membranen anschließend mit den entsprechenden an Horseradish-Peroxidase (HRP) gekoppelten Zweitantikörpern in 4 % (wt/vol) BSA in TBS-Puffer für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Folgende Sekundärantikörper wurden verwendet:

Anti-Kaninchen IgG	1:2000 in 4 % (wt/vol) BSA/TBS
Anti-Maus IgG	1:2000 in 4 % (wt/vol) BSA/TBS
Anti-Ziege IgG	1:5000 in 4 % (wt/vol) BSA/TBS

Anschließend wurden die Membranen dreimal für zehn Minuten in TBS-Puffer gewaschen. Zur Detektion der Proteine wurden die Membranen kurz in ECL-Entwickler-Lösung geschwenkt, wodurch die chemilumineszierende Peroxidase-Reaktion in Gang gesetzt wurde. Die dadurch entstehende Chemilumineszenz konnte nun mittels einer CCD-Kamera aufgenommen und anschließend mit Hilfe des Softwareprogramms „Quantity One“ quantifiziert werden.

3.4 GSK-3 β -Aktivitätsmessung

3.4.1 Probenvorbereitung und Proteinmengenbestimmung

Zur Isolierung des Gesamtproteins wurden die Herzmuskelzellen von entsprechender Inkubationszeit und -bedingung (Normoxie; Anoxie; Reoxygenation und Reoxygenation mit SB216763) nach Absaugen des Inkubationsmediums auf Eis gelegt und die Zellen mit 200 μ l eiskaltem RIPA-Puffer und 10 μ l (50 U/ml) Benzonase lysiert. Nun konnten die Zellen mittels eines Einmalschabers von der Kulturschale abgeschabt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt werden. Hier wurde in ein Reaktionsgefäß das Lysat aus zwei Schalen überführt, die beide die gleiche Vorbehandlung hatten. Nachdem die Proben für 30 Minuten in Eis gesteckt wurden, wurden sie mit einem Pestler homogenisiert und bei 8000 \times g und 4°C für zwei Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und in Eis gesteckt. Mit diesen Zelllysaten wurden dann die Proteinbestimmung und die Radioaktivitätsmessung durchgeführt.

RIPA-Stocklösung:

Tris/HCl (pH 7,5)	50 mM
Deoxycholat (wt/vol)	0,5 %
NaCl	150 mM
Nonidet P-40 (wt/vol)	1 %
SDS (wt/vol)	0,1 %

RIPA-Puffer:

1 ml RIPA-Stocklösung	
β -Glycerophosphat	40 mM
EDTA (pH8,0)	1 mM
Pepstatin	1 μ l/ml
PMSF	1 mM

Die Proteinbestimmung wurde nach Lowry durchgeführt [Lowry et al., 1951]. Dafür wurde mit Rinderserumalbumin eine Standardreihe der Konzentration 0; 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 und 1 mg/ml vorbereitet. Außerdem wurden folgende Lösungen und Reagenzien vorbereitet:

Lösung 1: Natrium-Kalium-Tartrat ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$)
3,3g in 100 ml Aqua bidest

Lösung 2: Kupfersulfat ($\text{Cu}_2\text{SO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$)
1,25g in 100 ml Aqua bidest

Lösung 3: Natriumcarbonat (Na_2CO_3 , wasserfrei)
25g in 1000 ml Aqua bidest

Lösung 4: 1 N NaOH
4g in 100 ml Aqua bidest

Lösung 5: Folin-Ciocalteu'sches Phenolreagenz (Merck 9001)
22,73 ml Originalreagenz auf 100 ml mit Wasser aufgefüllt

Reagenz A: Lösung 1 200 μl
 Lösung 2 200 μl
 Lösung 3 19,6 ml

Daraufhin wurden die Proben und Standards nach folgenden Schemata vorbereitet:

<u>10 μl Zelllysats (Überstand) +</u>	<u>50 μl Standard +</u>
50 μl Wasser	10 μl RIPA- Puffer
50 μl Lösung 4	50 μl Lösung 4
500 μl Reagenz A	500 μl Reagenz A

Nachdem diese Proben und Standards zehn Minuten bei Raumtemperatur standen, wurde zu ihnen je 100 μl Lösung 5 hinzugefügt. Anschließend wurden sie für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und für weitere 30 Minuten bei 8000×g zentrifugiert.

Von den nun bereiten Proben und Standards wurden je 200 μl auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Daraufhin erfolgte mithilfe des Photometers die Proteinmengenmessung bei 578 nm Absorption. Die Proteinkonzentrationen ergaben sich durch rechnerischen Vergleich der gemessenen Extinktionen der Proben mit denen der Eichkurve.

3.4.2 GSK-3 β -Immunopräzipitation

Die Aktivität der GSK-3 β wurde mit einem „GSK-3 β Activity Assay Kit“ von Sigma-Aldrich bestimmt. Die dazugehörigen Bestandteile sind im Kapitel 2.1 aufgelistet. Die Vorbereitung der einzelnen Komponenten und alle Schritte der Messung wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

Für diese Methode wurden neben der eigentlichen GSK-3 β -Aktivitätsmessung drei Negativ-Kontrollen durchgeführt. Bei der ersten Kontrolle (Negativ-Kontrolle 1) wurde der Versuch ohne Substrat, bei der zweiten Kontrolle (Negativ-Kontrolle 2) ohne Antikörper durchgeführt und bei der dritten Kontrolle (Inhibitor) wurde eine GSK-3 Inhibitor-Lösung (SB 415286) hinzugefügt.

Mit Hilfe von Affinitäts-Gelperlen „EZview™ Red Protein G Affinity Gel“ und eines Anti-GSK-3 β -Antikörpers wurde GSK-3 β im Zelllysate immunopräzipitiert. Als Nächstes wurde das immunopräzipitierte GSK-3 β -Protein mit einem Peptid-Substrat in Anwesenheit von γ -³²P-ATP inkubiert. Anschließend wurde der Einbau des γ -³²P in das Substrat gemessen.

Die Proben für die Aktivitätsmessung wurden nach folgendem Schema vorbereitet:

1 Probe für die Aktivitäts-Messung:

EZview™ Red Protein G Affinity Gel	30 μ l
Zelllysate	320-350 μ l (>200 μ g)
DMSO (10 %)	10 μ l
GSK-3 β -Antikörper	2 μ l
GSK-3 β -Substrat	5 μ l

Danach wurde im Radioaktiv-Kontrollbereich folgende Radioaktiv-Mixtur vorbereitet:

Radioaktiv-Mixtur:

Assay-Puffer	187,5 μ l
Wasch-Puffer	112,5 μ l
γ - ³² P-ATP	3,75 μ l

Die Reaktion wurde gestartet, indem zu jeder Probe 20 μ l Radioaktiv-Mixtur hinzugefügt wurde. Anschließend wurden die Proben bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Daraufhin wurden nach einer kurzen Zentrifugation (10 Sekunden bei

8000×g) von jeder Probe 25 µl Überstand auf je ein P81-Zellulose-Phosphat-Viereck pipettiert. Nach Nummerierung der Vierecke wurden sie in 0,5%ige Phosphorsäure viermal für je fünf Minuten gewaschen. Danach wurden die Vierecke für eine Minute mit Ethanol und für eine weitere Minute mit Azeton gewaschen.

Nach Trocknung der P81-Zellulose-Phosphat-Vierecke bei Raumtemperatur kamen sie in Counter-Fläschchen und wurden in einen β -Counter gestellt, wo die Radioaktivitätsmessung erfolgte.

Die gemessenen Counts wurden auf die nach Lowry bestimmte Proteinmenge bezogen und in Counts/µg Protein oder in % angegeben.

3.5 Statistik

Die Daten wurden als Mittelwerte \pm SEM von n verschiedenen Experimenten wiedergegeben.

Statistische Vergleiche wurden durch einfache Varianzanalyse (One-Way-ANOVA) unter Nutzung des Student-Newman-Keuls-Tests für post-hoc Analysen durchgeführt. Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

4 ERGEBNISSE

4.1 Proteingehalt, Phosphorylierung und Aktivität von GSK-3 β während Ischämie und Reperfusion

4.1.1 GSK-3 β -Proteingehalt unter Normoxie, Anoxie, Reoxygenation und Reoxygenation in Anwesenheit von SB216763

Mittels Western-Blot-Experimenten wurde der Proteingehalt der GSK-3 β untersucht. Als Kontrolle wurde das Zellstrukturprotein Vinculin verwendet. Wie in Abb. 4.1.1 gezeigt, konnte unter Anoxie, Reoxygenation und Reoxygenation in Anwesenheit von SB216763 keine signifikante Veränderung des GSK-3 β -Proteingehalts im Vergleich zu den normoxischen Kontrollbedingungen festgestellt werden.

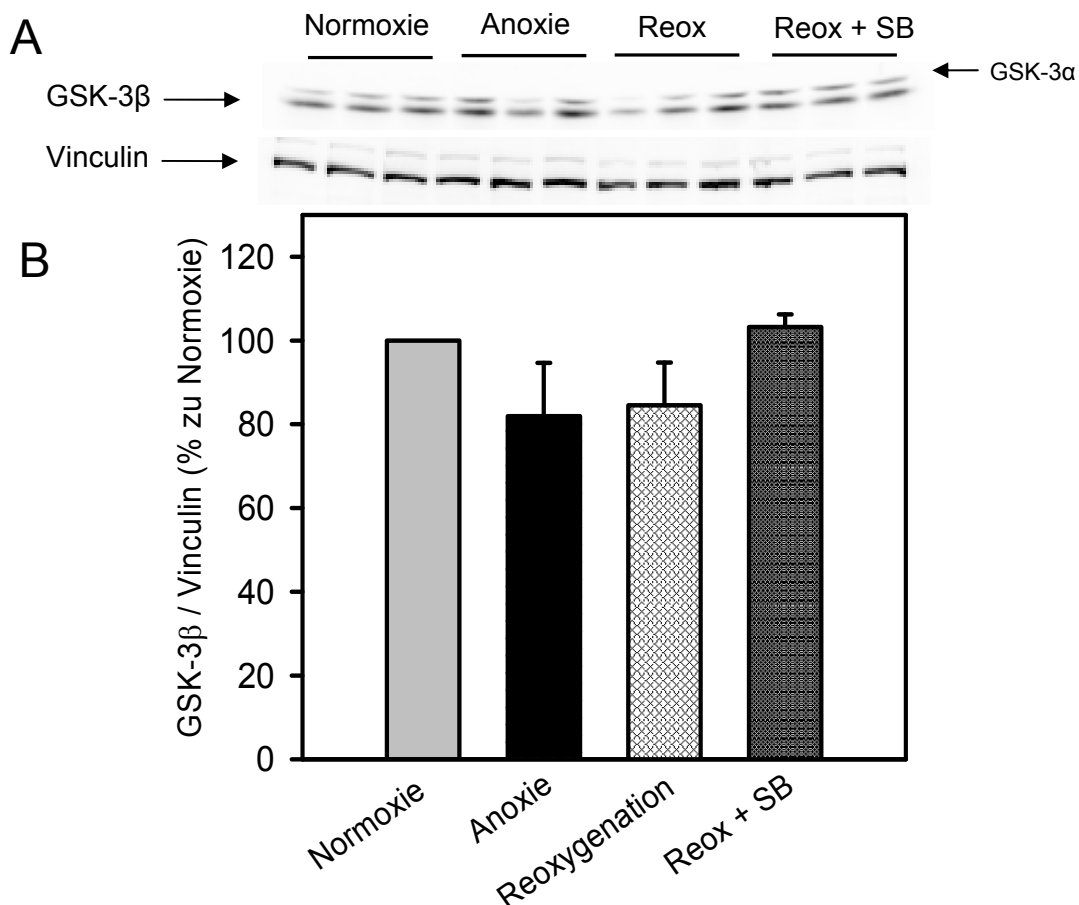


Abb 4.1.1 (A) Repräsentative Western-Blots von GSK-3 β und Vinculin.

(B) Densitometrische Western-Blot-Auswertung. GSK-3 β -Proteingehalt bezogen auf Vinculin in % zur Normoxie unter den Bedingungen: Normoxie (60 min), Anoxie (60 min), Reoxygenation (20 min) und Reoxygenation in Anwesenheit von 6 μ M SB216763 (Reox + SB; 20 min). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (n=3). Der normoxische Wert wurde auf 100 % gesetzt.

4.1.2 Phosphorylierung der GSK-3 β an Serin 9 unter Normoxie, Anoxie, Reoxygenation und Reoxygenation in Anwesenheit von SB216763

Da die GSK-3 β durch Phosphorylierung an Serin 9 gehemmt wird, wurde der Phosphorylierungsstatus der GSK-3 β untersucht. Abb. 4.1.2 zeigt, dass die Serin 9-Phosphorylierung der GSK-3 β unter Anoxie, Reoxygenation und Reoxygenation in Anwesenheit von SB216763 keinen signifikanten Unterschied zu den normoxischen Kontrollbedingungen aufwies.

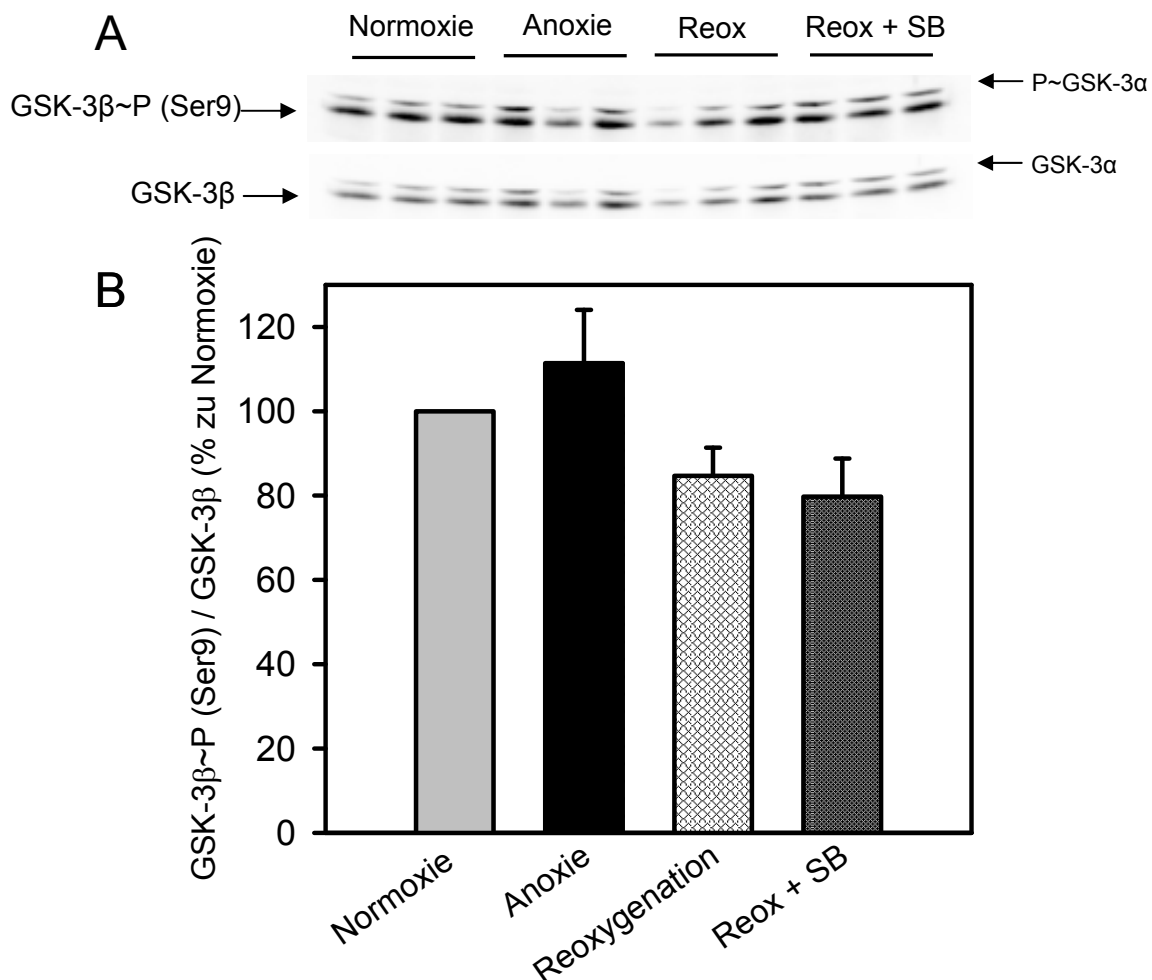


Abb. 4.1.2 (A) Repräsentative Western-Blots von GSK-3 β und GSK-3 β ~P (Serin 9). **(B)** Densitometrische Western-Blot-Auswertung. Phosphorylierung der GSK-3 β an Serin 9 bezogen auf Gesamt-GSK-3 β in % zur Normoxie unter den Bedingungen: Normoxie (60 min), Anoxie (60 min), Reoxygenation (20 min) und Reoxygenation in Anwesenheit von 6 μ M SB216763 (Reox + SB; 20 min). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (n=5). Der normoxische Wert wurde auf 100 % gesetzt.

4.1.3 Phosphorylierung der GSK-3 β an Tyrosin 216 unter Normoxie, Anoxie, Reoxygenation und Reoxygenation in Anwesenheit von SB216763

In diesem Schritt wurde die aktivierende Phosphorylierung der GSK-3 β an Tyrosin 216 untersucht. Wie Abb. 4.1.3 zeigt, konnte auch hier keine signifikante Änderung der Tyrosin 216-Phosphorylierung der GSK-3 β unter Anoxie, Reoxygenation und Reoxygenation in Anwesenheit von SB216763 gegenüber den normoxischen Kontrollbedingungen festgestellt werden.

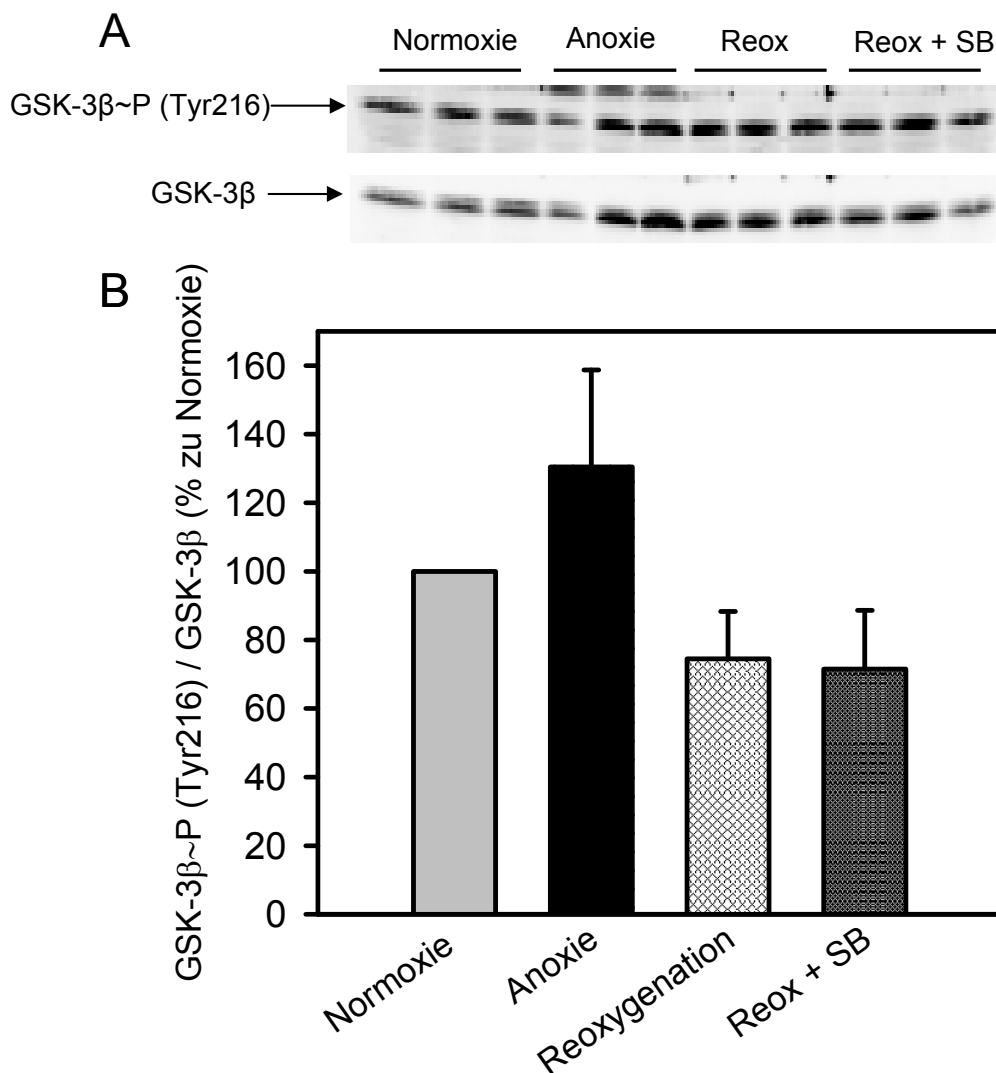


Abb. 4.1.3 (A) Repräsentative Western-Blots von GSK-3 β und GSK-3 β -P (Tyrosin 216). **(B)** Phosphorylierung der GSK-3 β an Tyrosin 216 bezogen auf Gesamt-GSK-3 β in % zur Normoxie unter den Bedingungen: Normoxie (60 min), Anoxie (60 min), Reoxygenation (20 min) und Reoxygenation in Anwesenheit von 6 μ M SB216763 (Reox + SB; 20 min). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (n=3). Der normoxische Wert wurde auf 100 % gesetzt.

4.1.4 GSK-3 β -Aktivität unter Normoxie, Anoxie, Reoxygenation und Reoxygenation in Anwesenheit von SB216763

Mit Hilfe eines Radioimmunassays wurde die Aktivität der GSK-3 β untersucht. Abb. 4.1.4 zeigt, dass sowohl unter Anoxie als auch unter Reoxygenation keine signifikante Aktivitätsänderung gegenüber den normoxischen Kontrollbedingungen festgestellt werden konnte. Die Applizierung des Inhibitors SB216763 während der Reoxygenation führte zu einer signifikanten Abnahme der GSK-3 β -Aktivität um mehr als drei Viertel gegenüber der Reoxygenation.

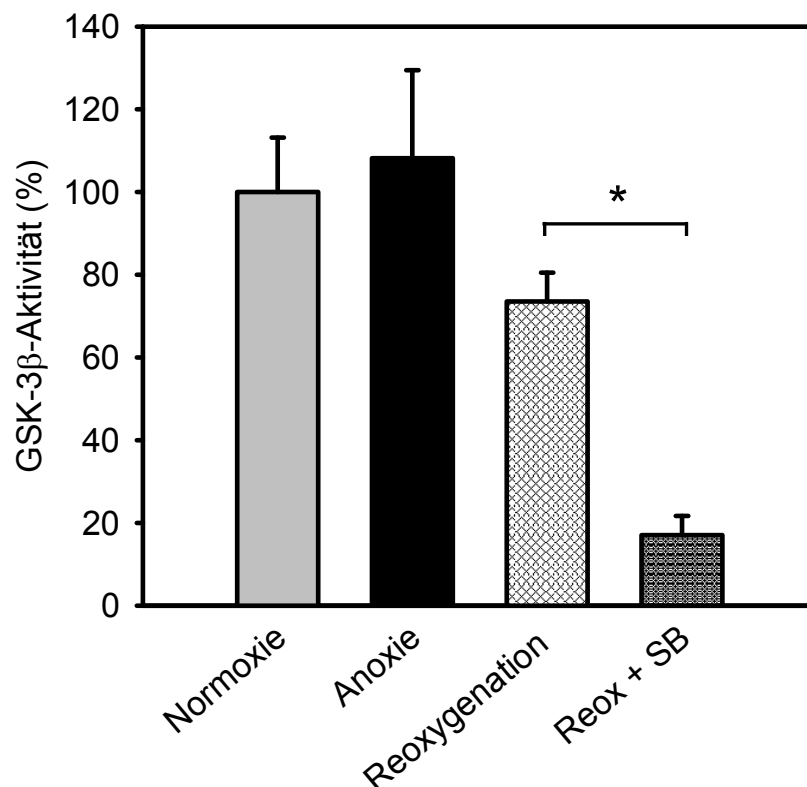


Abb. 4.1.4 GSK-3 β -Aktivität in % unter Normoxie (60 min), Anoxie (60 min), Reoxygenation (20 min) und Reoxygenation in Anwesenheit von 6 μ M SB216763 (Reox + SB; 20 min). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (n=3; * p < 0,05). Der Wert der GSK-3 β -Aktivität unter Normoxie wurde auf 100 % gesetzt.

4.2 Zeitverlauf der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und der Zelllänge isolierter Kardiomyozyten während Ischämie und Reperfusion

4.2.1 Exemplarischer Verlauf der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration während simulierter Ischämie und Reperfusion

Die simulierte Ischämie führte zu einer erhöhten zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in den Kardiomyozyten. Abb. 4.2.1 (links) zeigt exemplarisch den Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in einer Herzmuskelzelle während der Ischämie. Während der simulierten Reperfusion wurde eine Rückbildung dieser zytosolischen Ca^{2+} -Überladung beobachtet. Dieser Prozess kann, wie in Abbildung 4.2.1 (rechts) dargestellt, in drei Phasen geteilt werden:

In der ersten Phase fällt die Ca^{2+} -Konzentration schnell ab. In der zweiten Phase entwickeln sich hochfrequente Ca^{2+} -Oszillationen, die sich als Calciumspitzenkonzentrationen des Zytosols darstellen und ca. zehn Minuten dauern. In der dritten Phase vermindert sich die Frequenz und die Amplitude der Ca^{2+} -Oszillationen und die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration nähert sich wieder den normoxischen Ausgangswerten an.

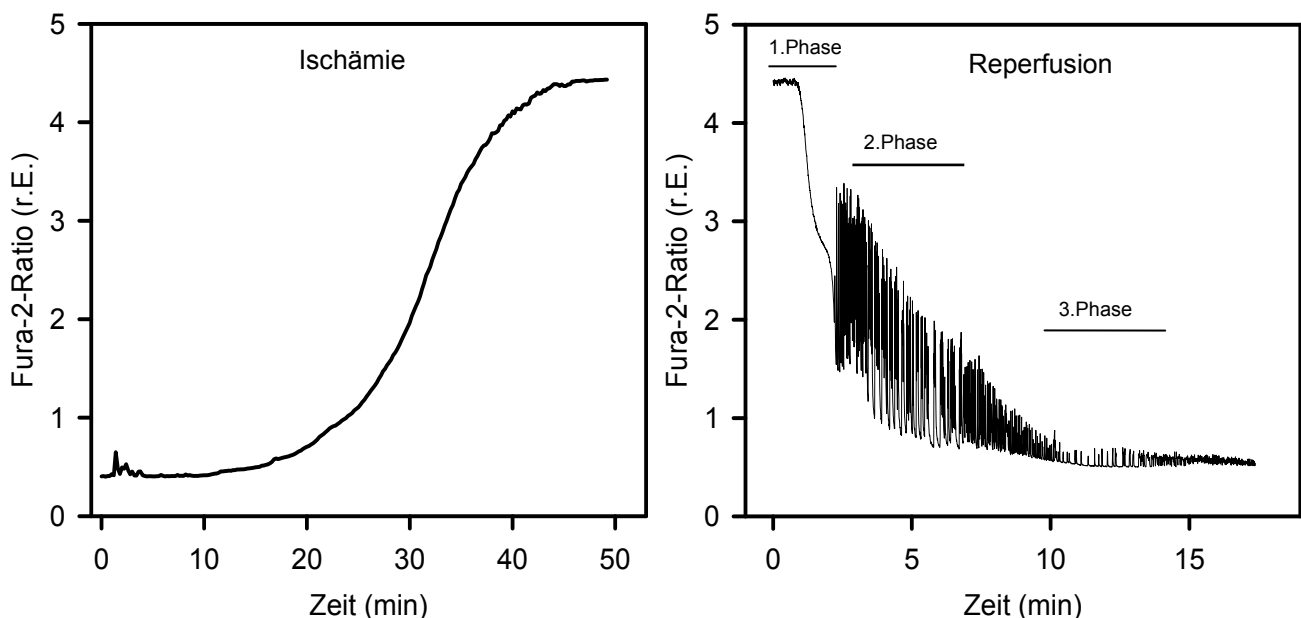


Abb. 4.2.1 Exemplarischer Verlauf der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (Fura-2 Ratio in relativen Einheiten) während simulierter Ischämie (rechts) und Reperfusion (links) unter Kontrollbedingungen.

4.2.2 Exemplarischer Verlauf der Zelllänge während Ischämie und Reperfusion

Wie in Abb. 4.2.2 exemplarisch gezeigt, verkürzten sich die Herzmuskelzellen unter ischämischen Bedingungen um ca. 30 % (Rigorkontraktur). In den frühen Minuten der Reperfusion verkürzten sich die Zellen um weitere 40 % ihrer normoxischen Ausgangslänge (Hyperkontraktur).

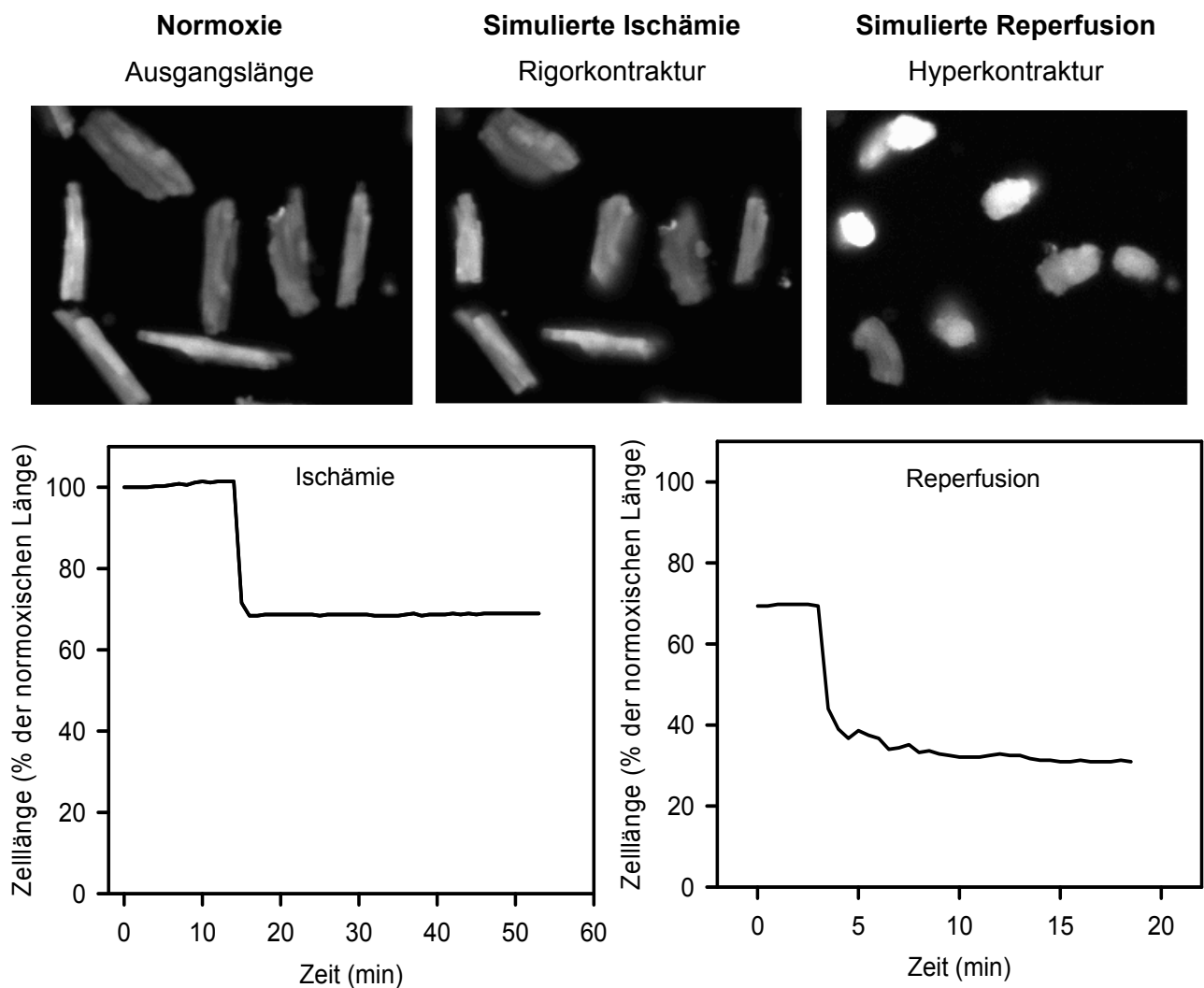


Abb. 4.2.2 OBEN: Repräsentative Bilder von isolierten Kardiomyozyten während der Normoxie, Ischämie und Reperfusion unter Kontrollbedingungen.

UNTEN: Exemplarischer Zeitverlauf der Zelllängenveränderung in % der normoxischen Ausgangslänge während simulierter Ischämie (links) und Reperfusion (rechts) unter Kontrollbedingungen.

4.3 Beeinflussung des Reperfusionsschadens durch die Hemmung der GSK-3 β

In einer Reihe von Experimenten wurde die Wirkung verschiedener Inhibitoren der GSK-3 β auf die Entwicklung von Hyperkontraktur, Nekrose und Ca²⁺-Oszillationen während der Reperfusion untersucht. SB216763 und GSK-3 β -Inhibitor XI hemmen beide die GSK-3 β durch Bindung an die ATP-Bindungsdomäne. Lithium hemmt die GSK-3 β , indem es mit Mg²⁺ um die Mg²⁺-Bindungsdomäne konkurriert.

4.3.1 Einfluss von Inhibitoren der GSK-3 β auf die Zelllänge der Kardiomyozyten

Um zu beurteilen, wie die Hemmung der GSK-3 β das Ausmaß der Hyperkontraktur beeinflusst, wurde die Zelllänge der Kardiomyozyten im Lauf der Reperfusion gemessen. Abbildung 4.3.1 zeigt die Zelllänge nach fünf Minuten Reperfusion. Alle in diesen Versuchen eingesetzten Inhibitoren führten zur signifikanten Reduzierung der Hyperkontraktur gegenüber der Kontrolle. In diesem Protokoll wurde SB in drei verschiedenen Konzentrationen (500 nM, 6 μ M und 50 μ M) getestet. In Anwesenheit von 6 μ M SB wurde die größte Reduzierung der Hyperkontraktur beobachtet.

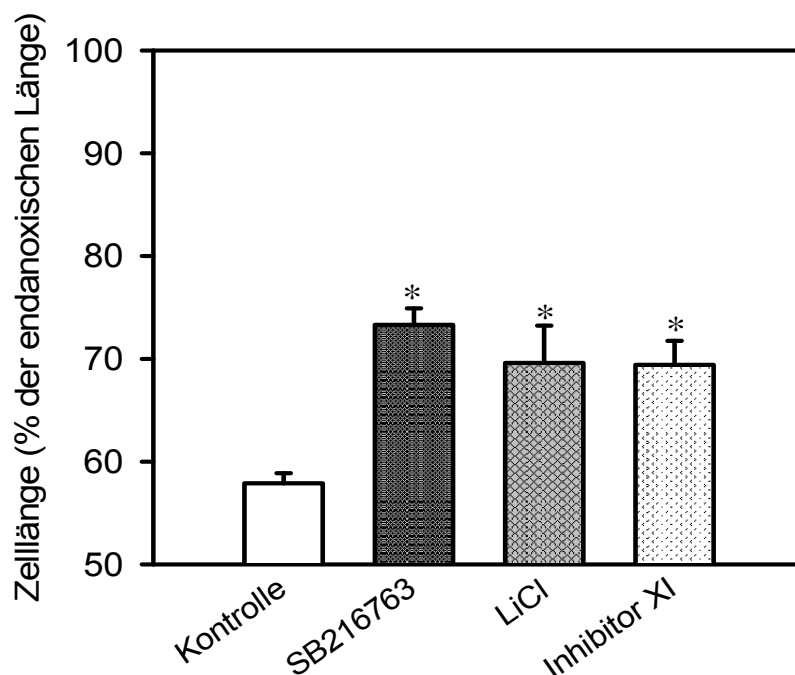


Abb. 4.3.1 Zelllänge in % der endischämischen Länge nach 5 Minuten Reperfusion unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit der Inhibitoren: SB216763 (6 μ M), LiCl (1 mM) oder GSK-3 β -Inhibitor XI (300 nM). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 4$ Experimente pro Bedingung, Zellen ≥ 22 pro Bedingung; * $p < 0,05$ vs. Kontrolle).

4.3.2 Auswirkung der Inhibitoren der GSK-3 β auf die Entwicklung der Nekrose

Ein wichtiger Aspekt des Reperfusionsschadens ist die Nekroseentwicklung. Unter Kontrollbedingungen entwickelten die meisten Zellen ($59,8 \pm 2,5$ %) nach dem Ende der Reperfusion einen nekrotischen Zelltod. Abbildung 4.3.2 zeigt, dass der Anteil der nekrotischen Zellen durch Anwesenheit der GSK-3 β -Inhibitoren während der Reperfusion signifikant reduziert wurde.

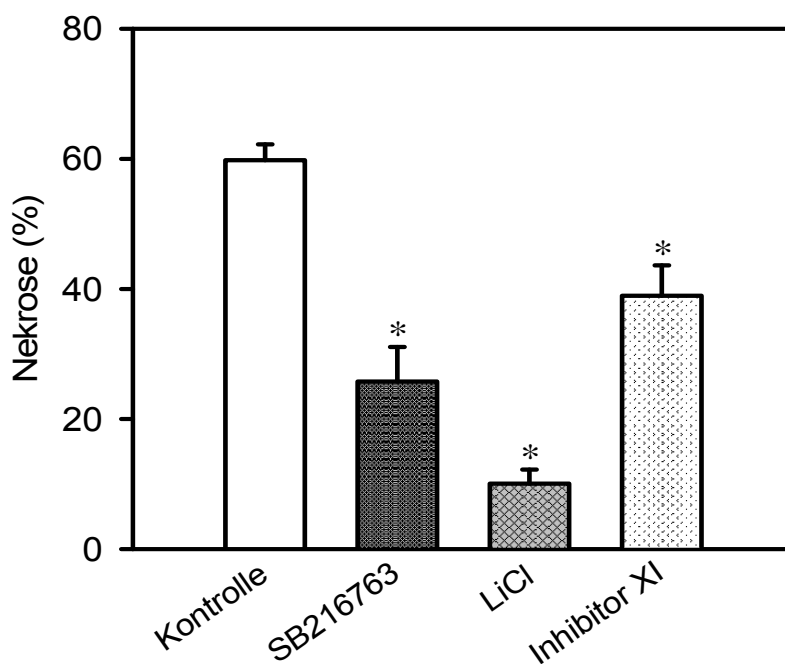


Abb. 4.3.2 Anteil der nekrotischen Zellen am Ende der Reperfusion unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit der Inhibitoren: SB216763 (6 μ M), LiCl (1 mM) oder GSK-3 β -Inhibitor XI (300 nM). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 4$ Experimente pro Bedingung, Zellen ≥ 285 pro Bedingung; * $p < 0,05$ vs. Kontrolle).

4.3.3 Einfluss der GSK-3 β -Inhibitoren auf die zytosolischen Ca²⁺-Oszillationen

In einer Reihe von Versuchen wurde mit Hilfe des Fluoreszenzstoffs Fura-2-AM die zytosolische Ca²⁺-Konzentration gemessen. Abbildung 4.3.3 zeigt den Verlauf der Ca²⁺-Oszillationsfrequenz während der Reperfusion. In Anwesenheit der Inhibitoren in der Reperfusion wurde die Frequenz der Ca²⁺-Oszillationen während der Reperfusion signifikant reduziert.

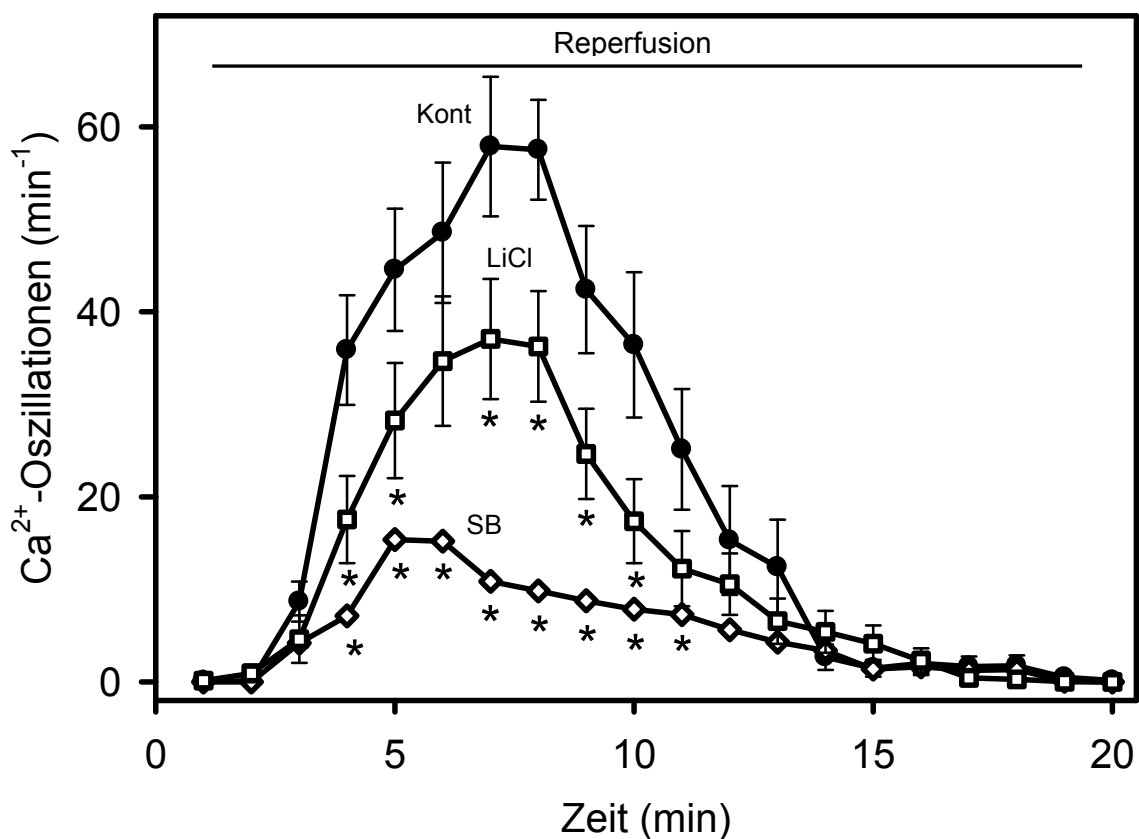


Abb. 4.3.3 Ca²⁺-Oszillationen (min⁻¹) während der Reperfusion unter Kontrollbedingungen (-●-) und in Anwesenheit von 6 μ M SB216763 (-◇-) oder 1 mM LiCl (-□-). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 4$ Experimente pro Bedingung, Zellen ≥ 22 pro Bedingung; * $p < 0,05$ vs. Kontrolle).

4.4 Auswirkung der GSK-3 β -Hemmung auf die mitochondriale Integrität

4.4.1 Auswirkung der GSK-3 β -Hemmung auf die Öffnung der mitochondrialen Permeabilität-Transition-Poren

Mit Hilfe der Calcein-Cobalt-Methode wurde die Öffnung der MPTP untersucht. Im Gegensatz zur Anoxie, während der die mitochondriale Calcein-Fluoreszenz stabil blieb, induzierte die Reperfusion einen Abfall der Fluoreszenz um $42,6 \pm 2,8$ % unter Kontrollbedingungen (Abb. 4.4.1). Dieser Fluoreszenzverlust markiert die Öffnung der MPTP. Dafür spricht die Tatsache, dass die Applikation des direkten MPTP-Inhibitors Cyclosporin A während der Reperfusion diesen Fluoreszenzverlust signifikant reduzierte. In Anwesenheit von SB216763 während der Reperfusion konnte der Verlust der mitochondrialen Calcein-Fluoreszenz gegenüber den Kontrollbedingungen signifikant verringert werden.

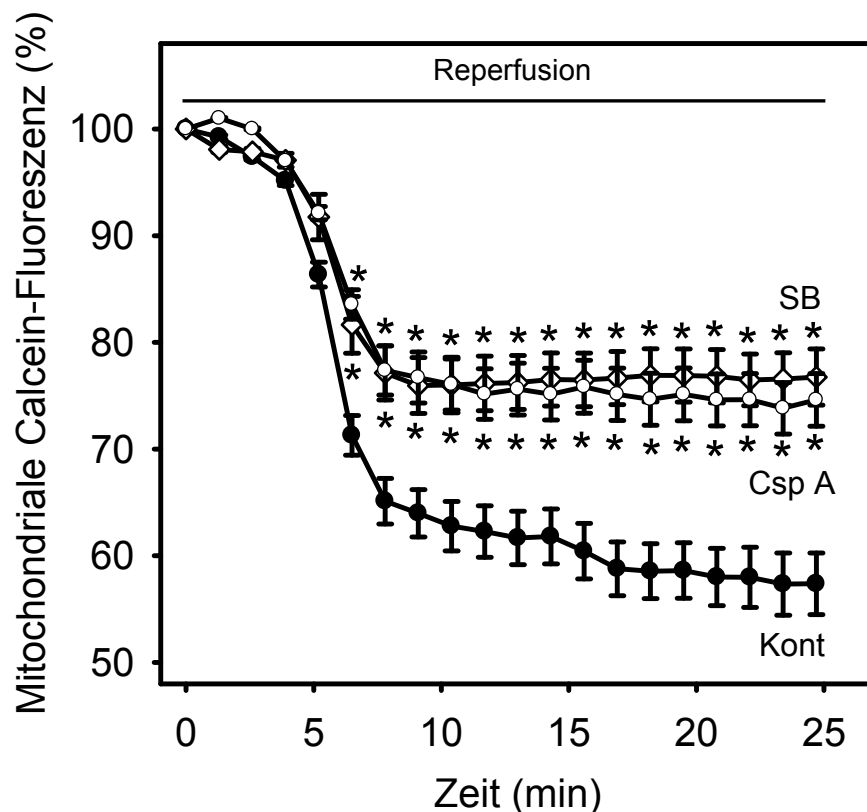


Abb. 4.4.1 Mitochondriale Calceinfloureszenz in % während der Reperfusion unter Kontrollbedingungen (-●-) und in Anwesenheit von 6 μ M SB216763 (-◇-) oder 500 nM Cyclosporin A (-○-). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 7$ Experimente pro Bedingung, Zellen ≥ 28 pro Bedingung; * $p < 0,05$ vs. Kontrolle). Die Werte am Anfang der Reperfusion wurden auf 100 % gesetzt.

4.4.2 Exemplarischer Zeitverlauf des mitochondrialen Membranpotentials während Ischämie und Reperfusion

Die Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials wurden mit Hilfe des mitochondrialen JC-1-Fluoreszenz-Ratios analysiert. Wie in Abb. 4.4.2 exemplarisch dargestellt, führte die simulierte Ischämie zur Abnahme des JC-1-Fluoreszenz-Ratios, was eine Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials widerspiegelt. Am Anfang der Reperfusion zeigte das mitochondriale Membranpotential eine transiente Erholung, die nach wenigen Minuten von einem Kollaps gefolgt wurde. Nach diesem Kollaps zeigte sich im Laufe der Reperfusion keine weitere Erholung.

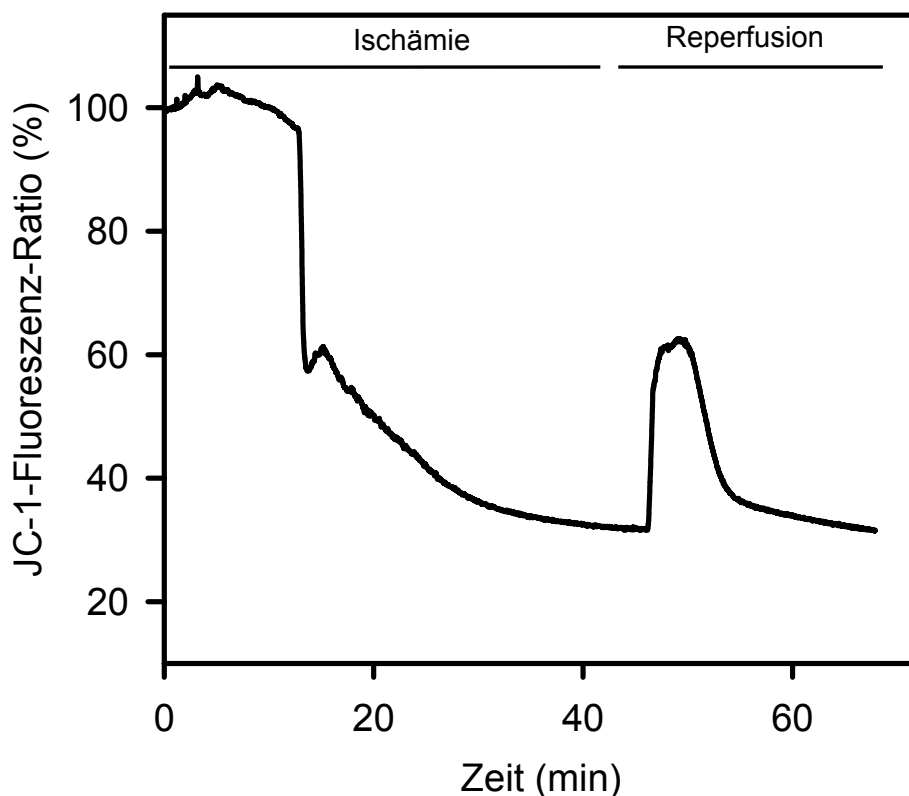


Abb. 4.4.2 Exemplarischer Verlauf des mitochondrialen JC-1-Fluoreszenz-Ratios in % während der simulierten Ischämie und Reperfusion. Der normoxische Ausgangswert wurde auf 100 % gesetzt.

4.4.3 Effekt der GSK-3 β -Hemmung auf das mitochondriale Membranpotential

Abbildung 4.4.3 zeigt den Verlauf des mitochondrialen JC-1-Fluoreszenz-Ratios während der Reperfusion. Die normoxischen Ausgangswerte (vor der simulierten Ischämie und Reperfusion) wurden auf 100 % gesetzt. Die Hemmung der GSK-3 β mit SB216763 führte zu einer signifikanten Abschwächung des Kollapses des JC-1-Fluoreszenz-Ratios und somit zu einer besseren Erholung des mitochondrialen Membranpotentials im Vergleich zur Kontrolle.

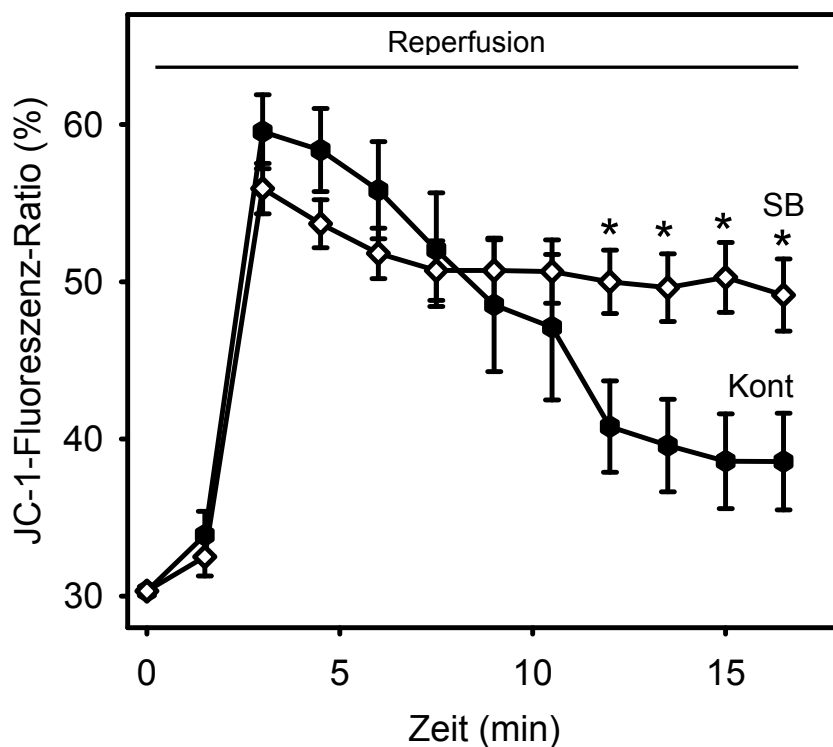


Abb. 4.4.3 JC-1-Fluoreszenz-Ratio in % während der Reperfusion unter Kontrollbedingungen (-●-) und in Anwesenheit von 6 μ M SB216763 (-◇-). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 7$ Experimente pro Bedingung, Zellen ≥ 27 pro Bedingung; * $p < 0,05$ vs. Kontrolle). Die normoxischen Ausgangswerte wurden auf 100 % gesetzt.

4.5 Beeinflussung des Reperfusionsschadens durch GSK-3 β -Hemmung unter Blockade der MPTP-Öffnung

In weiteren Versuchen wurde während der Reperfusion neben SB216763 ein direkter Inhibitor der MPTP, Cyclosporin A, verwendet. Hier wurde Cyclosporin A in einer Konzentration appliziert, bei der eine maximale Kardioprotektion beobachtet wurde. Ziel dieser Untersuchung war herauszufinden, ob sich die Cyclosporin-vermittelte Protektion durch eine zusätzliche Hemmung der GSK-3 β steigern lässt.

4.5.1 Beeinflussung der Zelllänge durch SB216763 und Cyclosporin A

Als erstes wurde die Wirkung der Hemmstoffe auf das Ausmaß der Hyperkontraktur untersucht. Abbildung 4.5.1 zeigt, dass die Reduzierung der Hyperkontraktur in Anwesenheit von Cyclosporin A durch eine zusätzliche Applizierung von SB216763 signifikant verbessert wurde.

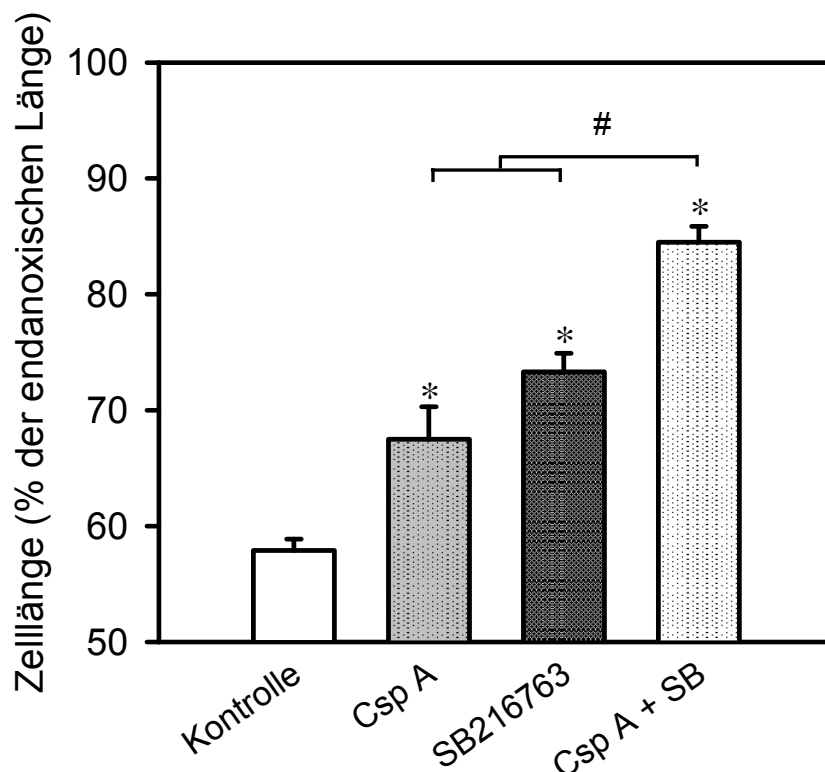


Abb. 4.5.1 Zelllänge nach 5 Minuten Reperfusion in % der endanoxischen Länge unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von Cyclosporin A (500 nM), SB216763 (6 μ M) oder Csp A (500 nM) + SB (6 μ M). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM (n \geq 5 Experimente pro Bedingung, Zellen \geq 21 pro Bedingung; * p < 0,01 vs. Kontrolle, # p < 0,01 vs. Csp A oder SB216763).

4.5.2 Einfluss von SB216763 und Cyclosporin A auf die Nekroseentwicklung

Als nächstes wurde die Wirkung der Inhibitoren auf die Entwicklung der Nekrose am Ende der Reperfusion untersucht. Wie in Abbildung 4.5.2 veranschaulicht, reduzierte die gleichzeitige Hemmung der GSK-3 β und der MPTP-Öffnung den Anteil der nekrotischen Zellen um mehr als 70 % im Vergleich zur alleinigen MPTP-Hemmung durch Cyclosporin A.

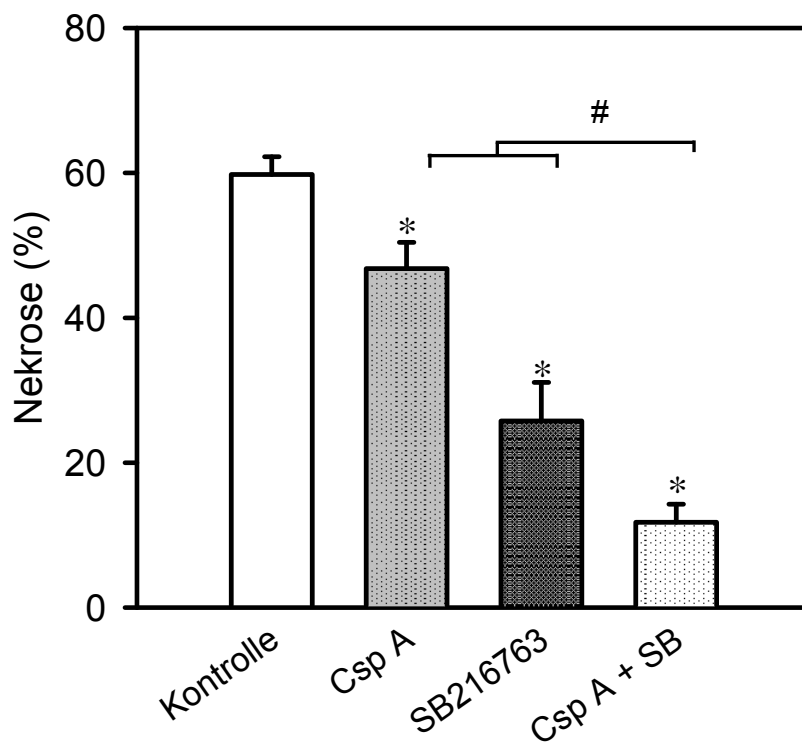


Abb. 4.5.2 Anteil der nekrotischen Zellen am Ende der Reperfusion unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von Cyclosporin A (500nM), SB216763 (6 μ M) oder Csp A (500nM) + SB (6 μ M). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 5$ Versuche pro Bedingung, Zellen ≥ 408 pro Bedingung; * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, # $p < 0,01$ vs. Csp A oder SB216763).

4.5.3 Effekt von SB216763 und Cyclosporin A auf das mitochondriale Membranpotential

Hier wurde der Effekt der Hemmstoffe auf die Erholung des mitochondrialen Membranpotentials untersucht. Sowohl SB216763 als auch Cyclosporin A führten zu einem, im Vergleich zur Kontrolle, signifikant erhöhten JC-1-Fluoreszenz-Ratio und somit zu einer besseren Erholung des mitochondrialen Membranpotentials. Die Applizierung von SB216763, zusätzlich zu Cyclosporin A, konnte die durch die Gabe von Cyclosporin A alleine erreichte Erholung des Membranpotentials signifikant steigern (Abb. 4.5.3).

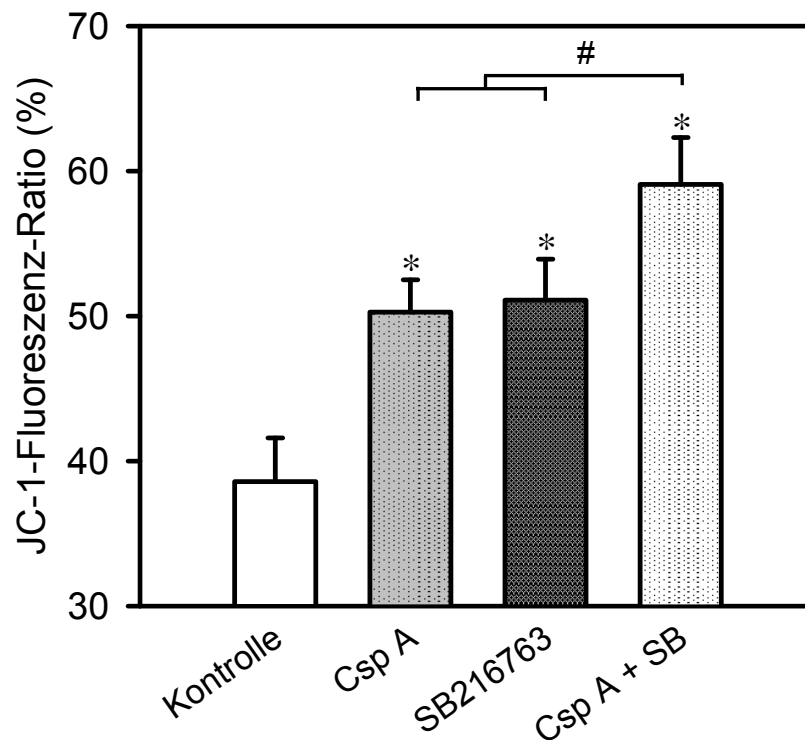


Abb. 4.5.3 JC-1-Fluoreszenz-Ratio in % nach 15 Minuten Reperfusion unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von Cyclosporin A (500 nM), SB216763 (6 μ M) oder Csp A (500 nM) + SB (6 μ M). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 5$ Experimente pro Bedingung, Zellen ≥ 21 pro Bedingung; * $p < 0,01$ vs. Kontrolle, # $p < 0,01$ vs. Csp A oder SB216763). Die normoxischen Ausgangswerte wurden auf 100 % gesetzt.

4.6 Beeinflussung des zytosolischen pH-Wertes durch Hemmung der GSK-3 β

4.6.1 Veränderungen des zytosolischen pH-Wertes während Ischämie und Reperfusion

Die simulierte Ischämie ($\text{pH}_a = 6,4$) führte zu einem Abfall des BCECF-Signals, was die Ansäuerung des Zytosols widerspiegelt (Abb. 4.6.1). Der Abfall des Signals von 100 % auf 60 % entspricht nach der Kalibrierung einem Abfall des pH-Wertes von 7,2 auf 6,4. In den ersten Minuten der Reperfusion wurde eine weitere leichte Abnahme des BCECF-Signals und damit des zytosolischen pH-Wertes beobachtet. Dieser anfänglichen Ansäuerung folgte im weiteren Verlauf der Reperfusion ein Anstieg des BCECF-Signals. Trotz dieses Anstiegs blieb das BCECF-Signal am Ende des Versuches unter dem normoxischen Ausgangswert.

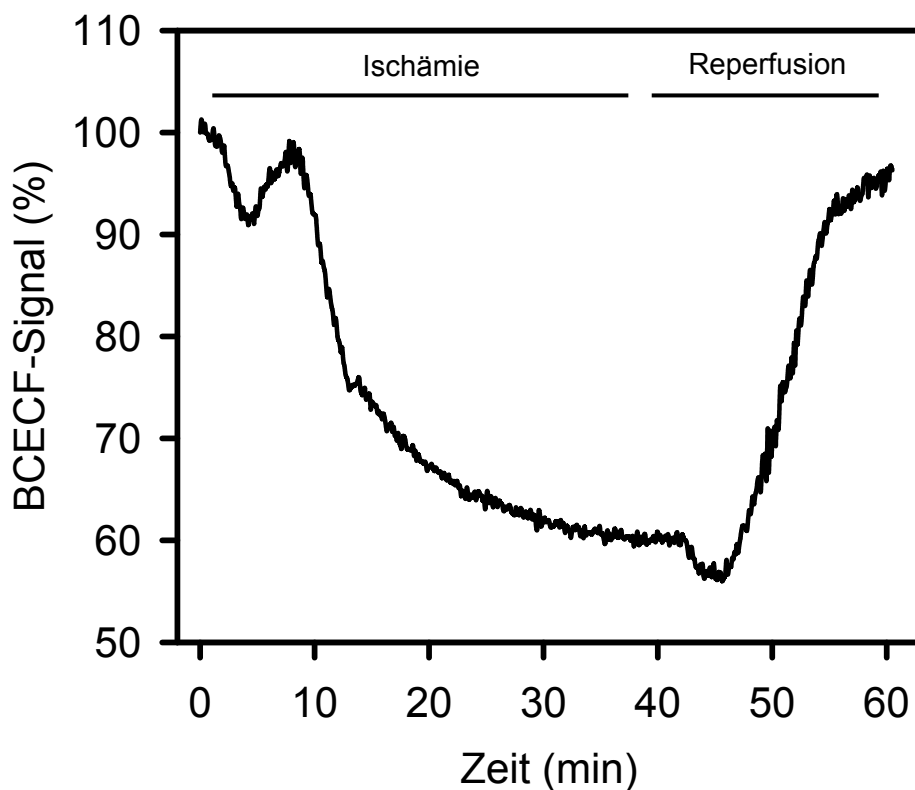


Abb. 4.6.1 Exemplarischer Verlauf des BCECF-Signals in % während simulierter Ischämie und Reperfusion. Der initiale Wert wurde auf 100 % gesetzt.

4.6.2 Einfluss von SB216763 auf den zytosolischen pH-Wert während der Reperfusion

In einer Reihe von Versuchen wurde die Auswirkung der GSK-3 β -Hemmung auf die Erholung des zytosolischen pH-Wertes während der Reperfusion analysiert. Wie in Abb. 4.6.2 veranschaulicht, führte SB216763 am Anfang der Reperfusion zu einer Verzögerung des Anstiegs des BCECF-Signals im Vergleich zur Kontrolle. Im weiteren Verlauf der Reperfusion stieg das BCECF-Signal und damit der zytosolische pH-Wert langsam an und erreichte einen höheren Wert als unter den Kontrollbedingungen.

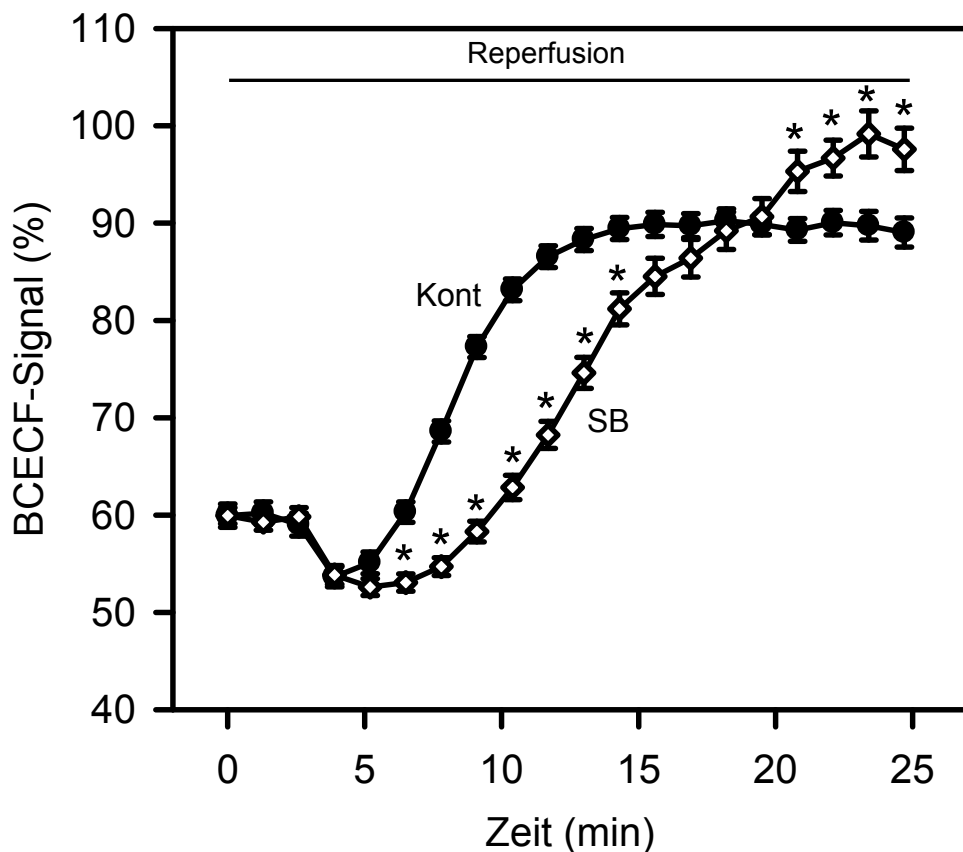


Abb. 4.6.2 BCECF-Signal in % während der Reperfusion unter Kontrollbedingungen (-●-) und in Anwesenheit von 6 μ M SB216763 (-◇-). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 10$ Experimente pro Bedingung, Zellen ≥ 40 pro Bedingung; * $p < 0,05$ vs. Kontrolle). Die normoxischen Ausgangswerte wurden auf 100 % gesetzt.

4.6.3 Beeinflussung des Na^+/H^+ -Austauschers durch die Hemmung der GSK-3 β

Da die pH-Erholung in isolierten Kardiomyozyten über den Na^+/H^+ -Austauscher erfolgt, haben wir die Aktivität dieses Austauschers unter normoxischen Bedingungen untersucht. Hier wurde die Ammoniumpuls-Methode angewandt (siehe Kapitel 3.2.7). Abb. 4.6.3 zeigt, dass das BCECF-Signal unmittelbar nach dem Einwaschen mit NH_4Cl deutlich anstieg, bevor es wieder zu Ausgangswerten abfiel. Das Auswaschen des NH_4Cl führte zu einem Signal-Abfall, was eine intrazelluläre Azidose anzeigt, gefolgt von einem Signal-Anstieg, der die zytosolische pH-Erholung widerspiegelt. In Anwesenheit der beiden GSK-3 β -Inhibitoren während des Ein- und Auswaschens des NH_4Cl dauerte die pH-Erholung gegenüber den Kontrollbedingungen dreimal so lang, was auf eine verminderte Aktivität des Na^+/H^+ -Austauschers zurückzuführen ist.

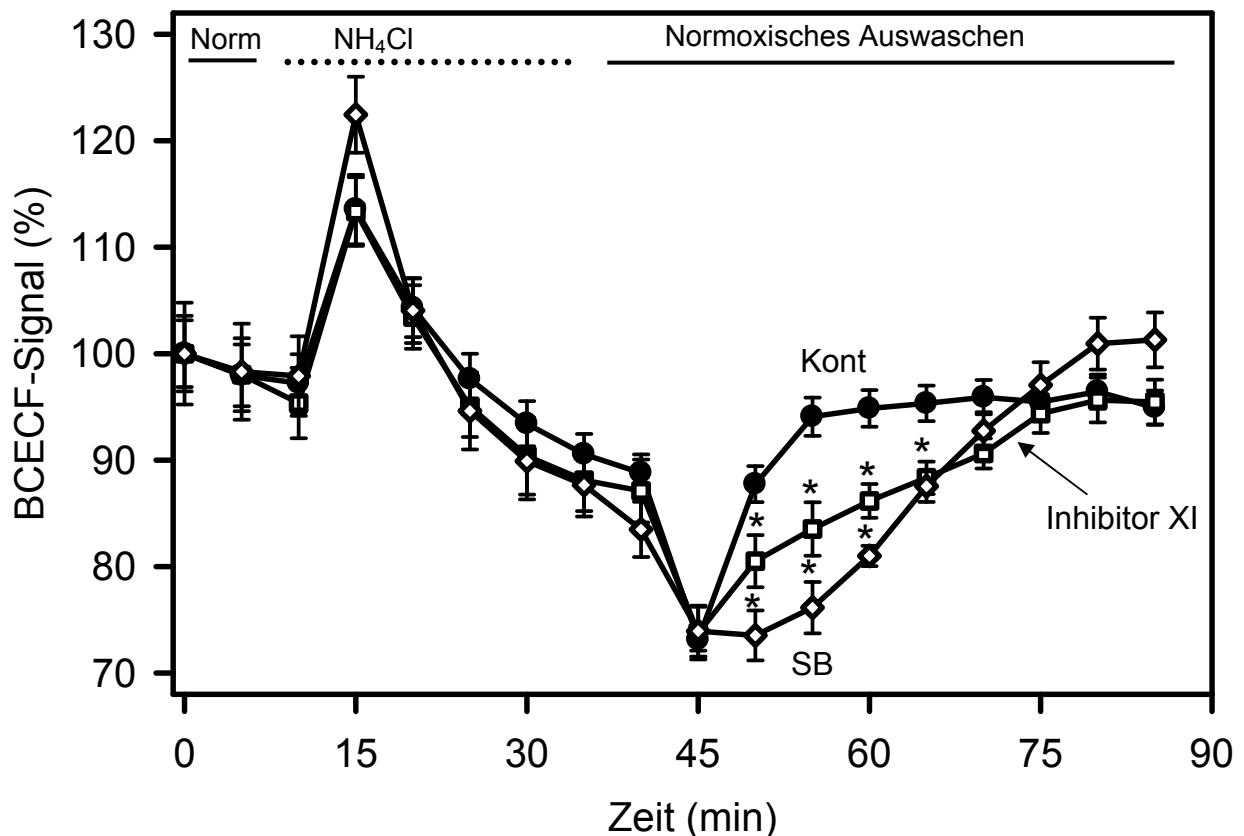


Abb. 4.6.3 BCECF-Signal in % während der Normoxie, dem Einwaschen mit NH_4Cl und dem anschließenden normoxischen Auswaschen unter Kontrollbedingungen (-●-) und in Anwesenheit von 6 μM SB216763 (-◇-) oder 300 nM GSK-3 β -Inhibitor XI (-□-) während des Ein- und Auswaschens des Ammoniums. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM ($n \geq 4$ Experimente pro Bedingung, Zellen ≥ 10 pro Bedingung; * $p < 0,05$ vs. Kontrolle). Die Werte am Anfang der Normoxie wurden auf 100 % gesetzt.

5 DISKUSSION

Zentrales Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, wie und durch welche Mechanismen die GSK-3 β -Inhibition den Reperfusionsschaden beeinflusst. Die wichtigsten Befunde sind:

- 1) Sowohl der Proteingehalt als auch die Phosphorylierung der GSK-3 β bleiben während der Anoxie und Reoxygenation im Vergleich zu den normoxischen Kontrollbedingungen unverändert. Auch die Aktivität der GSK-3 β während simulierter Ischämie und Reperfusion zeigt gegenüber der normoxischen Aktivität keine signifikante Veränderung.
- 2) Die Inhibition der GSK-3 β während der Reperfusion schützt die Kardiomyozyten vor der Reperfusion-induzierten Entwicklung von Hyperkontraktur und Nekrose.
- 3) Dieser protektive Effekt ist auf eine Reduktion der zytosolischen Ca²⁺-Oszillationen und eine Hemmung der Öffnung der mitochondrialen Permeabilität-Transition-Poren während der Reperfusion durch die GSK-3 β -Inhibition zurückzuführen.
- 4) Diesen Wirkungen liegt eine verlangsamte pH-Erholung der Kardiomyozyten in der Frühphase der Reperfusion durch eine Hemmung des Na⁺/H⁺-Austauschers zu Grunde.

5.1 Status der GSK-3 β während Ischämie und Reperfusion

Im ersten Schritt der Arbeit wurde der Proteingehalt und die Phosphorylierung der GSK-3 β unter den Bedingungen der Normoxie, Anoxie und Reoxygenation untersucht. Der GSK-3 β -Proteingehalt zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Bedingungen. Vergleichbare Befunde lieferte die Analyse des Phosphorylierungsstatus der GSK-3 β . Die hemmende Phosphorylierung der GSK-3 β an Serin zeigte unter Anoxie und Reoxygenation keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zur Normoxie. Die Untersuchung der aktivierenden Phosphorylierung der GSK-3 β an Tyrosin 216 lieferte ähnliche Ergebnisse. Auch hier

gab es unter Anoxie und Reoxygenation keine signifikante Veränderung der Phosphorylierung im Vergleich zur Normoxie.

Um diese Ergebnisse der Western-Blot-Analyse zu verifizieren, wurde mit Hilfe eines Radioimmunassays die Aktivität der GSK-3 β unter denselben oben beschriebenen Bedingungen direkt untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die Aktivität der GSK-3 β während Anoxie und Reoxygenation im Vergleich zu den normoxischen Kontrollbedingungen nicht verändert ist. Die Befunde weisen darauf hin, dass die GSK-3 β eine bemerkenswerte Grundaktivität in Kardiomyozyten aufweist. Die weiteren Ergebnisse zeigen, dass dieses Aktivitätslevel unter Reperusionsbedingungen negative Auswirkungen auf die Zellen hat.

Obwohl die Anwesenheit des GSK-3 β -Inhibitors SB216763 keinen Einfluss auf den GSK-3 β -Proteingehalt oder auf den Phosphorylierungsgrad der untersuchten Phosphorylierungsstellen (Serin 9 und Tyrosin 216) hatte, war die GSK-3 β -Aktivität in Anwesenheit von SB216763 auf ein Viertel reduziert. Dieser Befund ist auf den Hemmungsmechanismus von SB216763 zurückzuführen. SB216763 ist ein kompetitiver Hemmer, der an die ATP-Bindungsdomäne der GSK-3 β bindet und sie auf diesem Weg inhibiert. Proteingehalt und Phosphorylierung der GSK-3 β bleiben unverändert.

5.2 Protektion gegen den Reperfusionsschaden durch die GSK-3 β -Inhibition

In früheren Studien hat unsere Arbeitsgruppe den Mechanismus der Reperfusion-induzierten Hyperkontraktur auf zellulärer Ebene analysiert. In diesen Studien wurde festgestellt, dass den Ca²⁺-Oszillationen und den damit verbundenen starken transienten Erhöhungen der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration eine zentrale Rolle bei der Entstehung der Hyperkontraktur der Kardiomyozyten zukommt. Die Ca²⁺-Oszillationen entstehen durch repetitive Ca²⁺-Verschiebungen zwischen dem Zytosol und dem SR. Eine Applikation von Ryanodin in der Reperfusion führt zur Reduktion der Ca²⁺-Oszillationen und schützt so die reperfundierten Kardiomyozyten gegen die Hyperkontraktur [Piper et al., 2006, 2008]. Ryanodin hemmt die Ca²⁺-Freisetzungskanäle des SR, die Ryanodin-Rezeptoren. So kann das Ca²⁺ nicht ins Zytosol freigesetzt werden, was die Entstehung der Ca²⁺-Oszillationen verhindert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass eine Inhibition der GSK-3 β in der Reperfusion über diesen Mechanismus protektiv wirkt. In Anwesenheit der eingesetzten GSK-3 β -Inhibitoren in der Reperfusion wurden die Ca²⁺-

Oszillationen deutlich reduziert. Die Hyperkontraktur wurde signifikant abgeschwächt. Außerdem konnte der Anteil der nekrotischen Zellen durch die Applikation dieser Inhibitoren in der Reperfusion deutlich reduziert werden. Die Verbindung zwischen Hyperkontraktur und Nekrose ist aus In-vivo-Studien bekannt. In vivo, wo die schnelle Entwicklung der Hyperkontraktur ebenfalls zu beobachten ist [Garcia-Dorado et al., 1992, 1997], führt die Hyperkontraktur-induzierte Schädigung zum histologischen Bild der „Kontraktionsbandennekrosen“ [Ganote, 1983]. Diese Kontraktionsbandennekrosen zeigen sich als Nekrosen der Kardiomyozyten mit sarkolemmalen Brüchen und teils hyperkontrahierten, teils zerrissenen Resten der myofibrillären Strukturen.

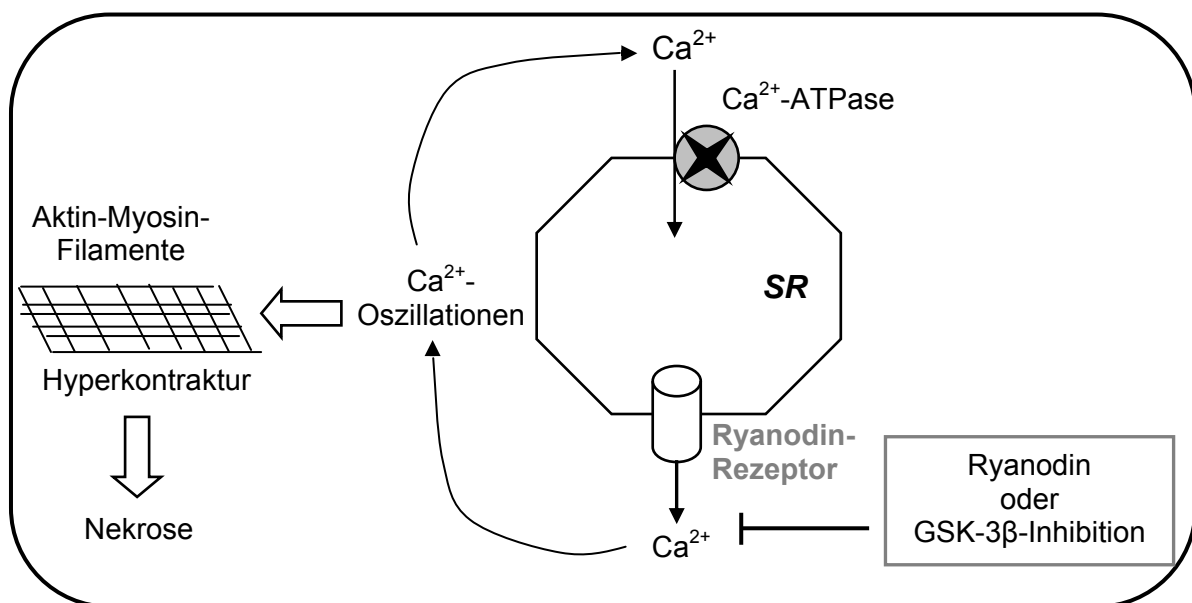


Abb. 5.1 Hemmung der Ca²⁺-Oszillationen, der Hyperkontraktur und der Nekrose durch Ryanodin. Die GSK-3β-Inhibition simuliert diesen Protektionsmechanismus.

Ein weiterer Schädigungsmechanismus, bei dem die Ca^{2+} -Oszillationen eine große Rolle spielen, ist die Öffnung von mitochondrialen Permeabilität-Transition-Poren (MPTP). In den ersten Minuten der Reperfusion induzieren die Ca^{2+} -Oszillationen eine Ca^{2+} -Aufnahme durch die Mitochondrien, was in einer mitochondrialen Ca^{2+} -Überladung resultiert. Diese mitochondriale Ca^{2+} -Überladung gilt als eine Hauptursache für die Öffnung der MPTP [Halestrap et al., 2004]. Dieser MPTP-Öffnung kommt eine zentrale Rolle bei der Entwicklung des nekrotischen Zelltodes zu [Miura und Miki, 2009]. Die MPTP sind Kanäle, die eine direkte Verbindung der mitochondrialen Matrix mit dem Zytosol herstellen und für große Moleküle bis 1,5 kDa durchgängig sind. Die Öffnung der MPTP führt zu einem Verlust der mitochondrialen Funktion. So können Mitochondrien mit MPTP-Öffnung weder an der Beseitigung der zytosolischen Ca^{2+} -Überladung noch an der aeroben Energiegewinnung teilnehmen. Beides resultiert in einer verminderten Erholung der Kardiomyozyten bis hin zum Zelltod im absoluten Energiemangel [Piper et al., 2008]. Kardioprotektive Effekte der MPTP-Hemmung sind in mehreren Studien untersucht worden. In diesem Zusammenhang konnte z.B. gezeigt werden, dass die pharmakologische Hemmung der MPTP am Anfang der Reperfusion die Infarktgröße am reperfundierten Rattenmyokard reduziert [Bhamra et al, 2008]. Piot et al. haben gezeigt, dass die intravenöse Gabe von Cyclosporin A im Rahmen eines drohenden Myokardinfarkts zur Reduktion der Infarktgröße und zur Verbesserung der Pumpfunktion am Menschen führt [Piot et al., 2008]

Unsere Ergebnisse legen dar, dass die Inhibition der GSK-3 β in der Reperfusion auch über diesen Mechanismus protektiv wirkt. Für die Analyse der Integrität der mitochondrialen Membran wurden zwei verschiedene Methoden, die Calcein-Cobalt-Methode und die JC-1-Methode angewandt. Bei beiden Methoden konnte der Reperfusion-induzierte Fluoreszenzabfall durch die Gabe des MPTP-Inhibitors Cyclosporin A während der Reperfusion signifikant reduziert werden. Dies spricht dafür, dass sowohl der Abfall der mitochondrialen Calcein-Fluoreszenz als auch des JC-1-Fluoreszenz-Ratios durch MPTP-Öffnung zustande kommt. Genau wie Cyclosporin A hemmte auch die GSK-3 β -Inhibition mit SB216763 in der Reperfusion signifikant den Abfall der mitochondrialen Calcein-Fluoreszenz und des JC-1-Fluoreszenz-Ratios, was die Hemmung der MPTP-Öffnung widerspiegelt. Außerdem konnte der Anteil der nekrotischen Zellen mit der Applikation der Inhibitoren SB216763 oder Cyclosporin A in der Reperfusion deutlich reduziert werden.

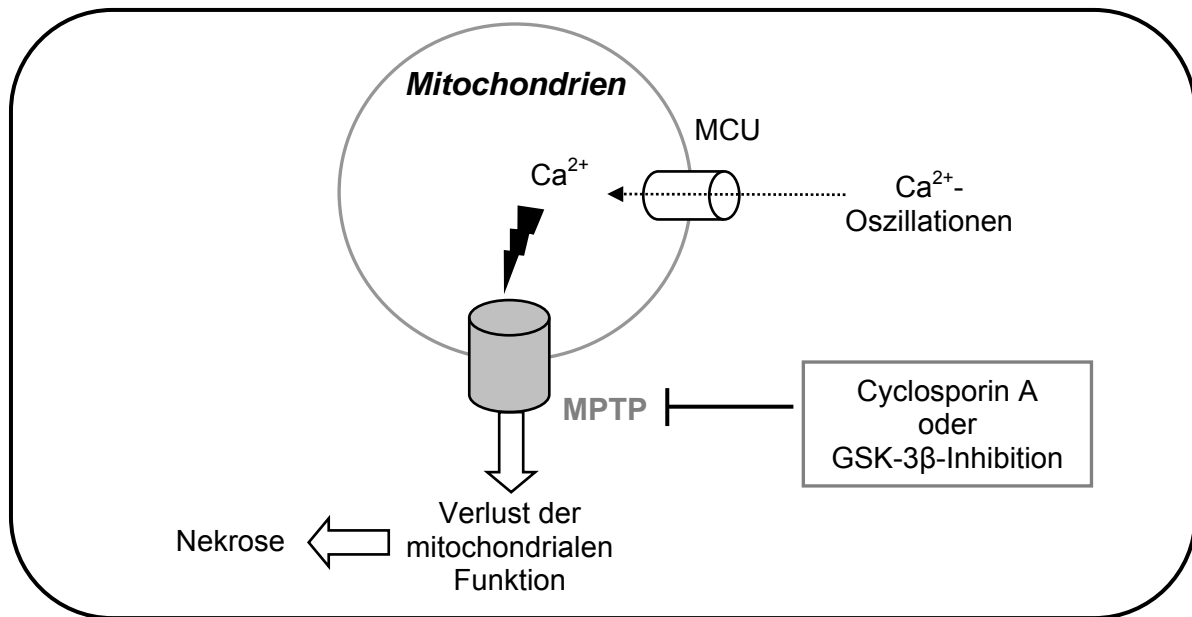


Abb. 5.2 Hemmung der MPTP-Öffnung und der Nekrose durch Cyclosporin A. Die Inhibition der GSK-3 β simuliert auch diesen Protektionsmechanismus.

Die Schlussfolgerung, dass die GSK-3 β -Inhibition in der Reperfusion über mehrere verschiedene Mechanismen protektiv wirkt, wird von den weiteren Ergebnissen bestätigt. So wurde zwischen der Wirkung vom MPTP-Inhibitor Cyclosporin A auf die Integrität des mitochondrialen Membranpotentials, die Hyperkontraktur und die Nekrose auf der einen Seite und der Wirkung einer kombinierten Gabe von Cyclosporin A und SB216763 auf dieselben Parameter auf der anderen Seite verglichen. Hier wurde Cyclosporin A in einer Konzentration appliziert, bei der bereits eine maximale Protektion beobachtet wurde.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die kombinierte Applikation beider Hemmstoffe in der Reperfusion zu einer deutlich stärkeren Stabilisierung des mitochondrialen Membranpotentials führte als die MPTP-Hemmung durch Cyclosporin A alleine. Dasselbe wurde bei der Entwicklung von Hyperkontraktur und Nekrose beobachtet. Hier war die Wirkung der kombinierten Applikation beider Inhibitoren in der Reperfusion jener von Cyclosporin A allein deutlich überlegen. Dies deutet darauf hin, dass die Hemmung der GSK-3 β ihre vor dem Reperfusionsschaden schützende Wirkung nicht nur über die MPTP-Hemmung allein, sondern zusätzlich über weitere Mechanismen entfaltet.

5.3 Die GSK-3 β -Inhibition und die pH-Erholung der Kardiomyozyten

Um zu untersuchen, über welchen Mechanismus die GSK-3 β -Hemmung den Reperfusionsschaden reduziert, haben wir die Beeinflussung des pH-Wertes durch die GSK-3 β -Inhibitoren analysiert. Es ist aus verschiedenen Studien bekannt, dass die Beibehaltung der Ischämie-induzierten Azidose in den ersten Minuten der Reperfusion eine Rolle bei der Protektion gegen den Reperfusionsschaden spielt. Interessanterweise kann auch die Azidose in der Frühphase der Reperfusion die beiden oben beschriebenen, durch GSK-3 β -Inhibition simulierten Mechanismen der Kardioprotektion, nachahmen. Es wurde gezeigt, dass die Azidose am Anfang der Reperfusion zu einer Reduktion der Ca²⁺-Oszillationen und der Hyperkontraktur führt [Ladilov et al., 1995]. Außerdem ist es bekannt, dass die Azidose in der Reperfusion die MPTP-Öffnung hemmt [Nicolli et al., 1993, 1996].

Weil unsere Ergebnisse gezeigt haben, dass die GSK-3 β -Hemmung ähnlich protektive Wirkungen aufweist wie die protektiven Wirkungen der Azidose in der Frühphase der Reperfusion, haben wir die Hypothese aufgestellt, dass die GSK-3 β -Hemmung über die Induzierung einer zytosolischen Azidose wirken könnte.

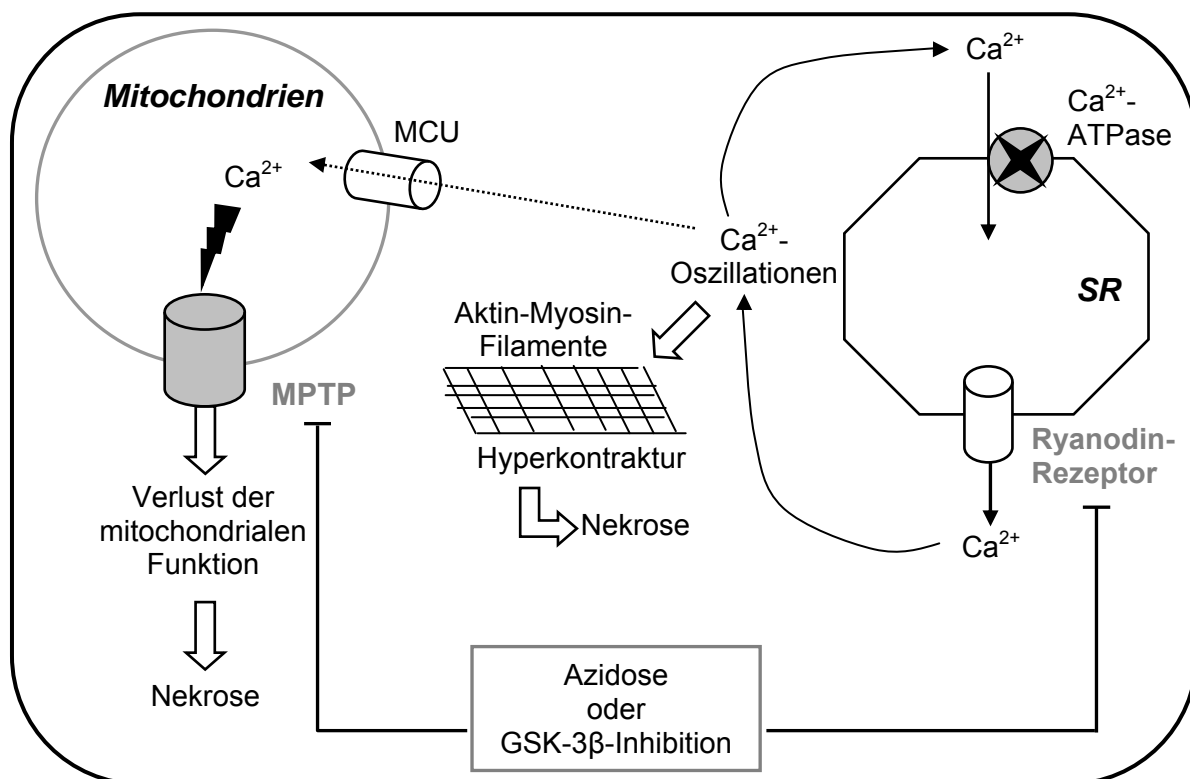


Abb. 5.3 Hemmung sowohl der Ca²⁺-Oszillationen und der Hyperkontraktur als auch der MPTP-Öffnung und der Nekrose durch die zytosolische Azidose in der frühen Reperusionsphase. Die GSK-3 β -Inhibition simuliert diese Protektionsmechanismen.

Aus diesem Grund wurde sowohl der Verlauf des pH-Wertes während simulierter Ischämie und Reperfusion als auch die Beeinflussung dieses pH-Verlaufs durch die GSK-3 β -Inhibition während der Reperfusion untersucht.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass es nach ca. zehn Minuten simulierter Ischämie zu einer deutlichen Ansäuerung des Zytosols der Kardiomyozyten kommt. In den ersten Minuten der Reperfusion wird ein weiterer Abfall des zytosolischen pH-Wertes beobachtet, bevor die rasche pH-Erholung des Zytosols einsetzt und der pH-Wert ansteigt. Obwohl diese pH-Erholung in den ersten Minuten der Reperfusion rasch erfolgte, konnte sie jedoch den normoxischen Ausgangswert nicht wieder erreichen. Die Anwesenheit des GSK-3 β -Inhibitors SB216763 während der Reperfusion führte zu einer signifikanten Verzögerung der zytosolischen pH-Erholung in der Frühphase der Reperfusion. Allerdings zeigte sich im weiteren Verlauf der Reperfusion eine im Vergleich zu den Kontrollbedingungen deutlich verbesserte pH-Erholung bis hin zum normoxischen Ausgangswert.

Die Azidose während der Ischämie wirkt einer durch die endischämische Ca²⁺-Überladung induzierte Überaktivierung schädlicher zellulärer Ca²⁺-abhängiger Vorgänge entgegen. Dazu gehört die Aktivierung des Aktin-Myosin-Apparates und verschiedener potentiell schädlicher Proteasen und Lipasen. Grund dafür ist die deutliche Verlangsamung der schädlichen Ca²⁺-abhängigen Vorgänge im azidotischen Zytosol [Ladilov et al., 1995; Piper et al., 2004]. Das Beibehalten dieser endischämischen Azidose in der frühen Reperfusion verlängert diesen Schutz und reduziert über diesen Weg den Reperfusionsschaden.

Es ist seit langem bekannt, dass die Anwesenheit von Protonen im Zytosol die Ryanodin-Rezeptoren des SR hemmt [Fabiato und Fabiato, 1978]. In diesem Fall kann kein Ca²⁺ aus dem SR freigesetzt werden und die Ca²⁺-Oszillationen werden gehemmt. Außerdem wurde gezeigt, dass die Ca²⁺-Sensibilität des kontraktile Apparates bei niedrigem zytosolischem pH-Wert deutlich vermindert ist [Marban und Kusuoka, 1987], was der Entwicklung der Hyperkontraktur entgegenwirkt.

Um die Kardiomyozyten vor der Entwicklung der Ca²⁺-Oszillationen und Hyperkontraktur zu schützen, muss der pH-Wert in der Frühphase der Reperfusion niedrig gehalten werden. Diese Frühphase der Reperfusion gilt als kritisches Zeitfenster sowohl für die Entstehung des Reperfusionsschadens als auch für die Protektion gegen diesen Schaden. Der Azidose-vermittelte Schutz gegen die

Hyperkontraktur am Anfang der Reperfusion wird durch den Anstieg des pH-Wertes im weiteren Verlauf der Reperfusion nicht rückgängig gemacht.

Ladilov et al. haben 1995 die Wirkungen der Azidose am Anfang der Reperfusion studiert. Am gleichen Modell, das in dieser Arbeit verwendet wurde, wurde der pH-Wert in den ersten zehn Minuten der Reperfusion bei pH=6,4 gehalten. Die Senkung der intrazellulären H^+ -Konzentration nach diesen zehn Minuten Reperfusion machte die Protektion gegen die Hyperkontraktur nicht rückgängig [Ladilov et al., 1995]. Interessanterweise verzögert die GSK-3 β -Hemmung die pH-Erholung über das kritische Zeitfenster hinaus und hält den pH-Wert auf ein Niveau, das von Ladilov et al. als protektiv ermittelt wurde.

Diese Protektion gegen die Hyperkontraktur durch die Azidose war vergleichbar mit der Protektion gegen die Hyperkontraktur durch die Gabe des direkten Inhibitors des kontraktile Apparates BDM (2,3-Butanedione monoxime) in der Reperfusion [Schlüter et al., 1991; Garcia-Dorado et al., 1992; Schlack et al., 1994]. Wenn BDM nach Normalisierung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration entfernt wird, entwickeln die Kardiomyozyten keine Hyperkontraktur mehr [Siegmond et al., 1991, 1993].

Neben der Hyperkontraktur wurde eine weitere Hauptursache für die Entwicklung der Nekrose, die MPTP-Öffnung durch die GSK-3 β -Inhibition signifikant reduziert. Hier kommt der verminderten mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme, die durch Reduktion der Ca^{2+} -Oszillationen resultiert, eine Bedeutung zu. Aber auch die durch die GSK-3 β -Inhibition induzierte Azidose spielt bei der MPTP-Hemmung eine große Rolle. Die Azidose hemmt die für die Formation der MPTP voraussetzende Bindung des Ca^{2+} an einen elementaren Bestandteil der MPTP, den Adenin-Nukleotid-Translokator. Des Weiteren wird unter Azidose ein weiterer Bestandteil der MPTP, Cyclophilin D, vom Adenin-Nukleotid-Translokator verdrängt, was die Formation der MPTP sehr erschwert [Nicolli et al., 1993, 1996].

Um herauszufinden ob die Azidifizierung des Zytosols durch die GSK-3 β -Inhibition durch Beeinflussung des Na^+/H^+ -Austauschers zustande kommt, wurde die Aktivität des Na^+/H^+ -Austauschers mit Hilfe der Ammoniumpuls-Methode untersucht. Hier induziert das normoxische Auswaschen des zuvor applizierten Ammoniums eine zytosolische Azidose, die durch den Na^+/H^+ -Austauscher beseitigt wird [Roos und Boron, 1981]. Die Ergebnisse unserer Untersuchung zeigen, dass die pH-Erholung in Anwesenheit der GSK-3 β -Inhibitoren während der Reperfusion im Vergleich zu den Kontrollbedingungen deutlich langsamer verläuft. Dies bedeutet, dass der Ausstrom

der H^+ -Ionen aus der Zelle durch den Na^+/H^+ -Austauscher durch die GSK-3 β -Inhibition verhindert wurde.

Snabaitis et al. haben in einer 2008 veröffentlichten Studie herausgefunden, dass die Proteinkinase B (PKB) den sarkolemmalen Na^+/H^+ -Austauscher in azidotischen Kardiomyozyten durch Phosphorylierung an Serin 648 hemmt. Die Aktivierung der PKB war in dieser Studie stets von einer hemmenden Phosphorylierung der GSK-3 β an Serin 9 begleitet [Snabaitis et al., 2008]. Da die PKB ein hemmender Upstream Regulator der GSK-3 β ist, ist es in Zusammenhang mit unseren Ergebnissen nahliegend, dass die beobachtete Hemmung des Na^+/H^+ -Austauschers über die Proteinkinase B über eine Hemmung der GSK-3 β zustande kommt oder von der Hemmung der GSK-3 β unterstützt wird.

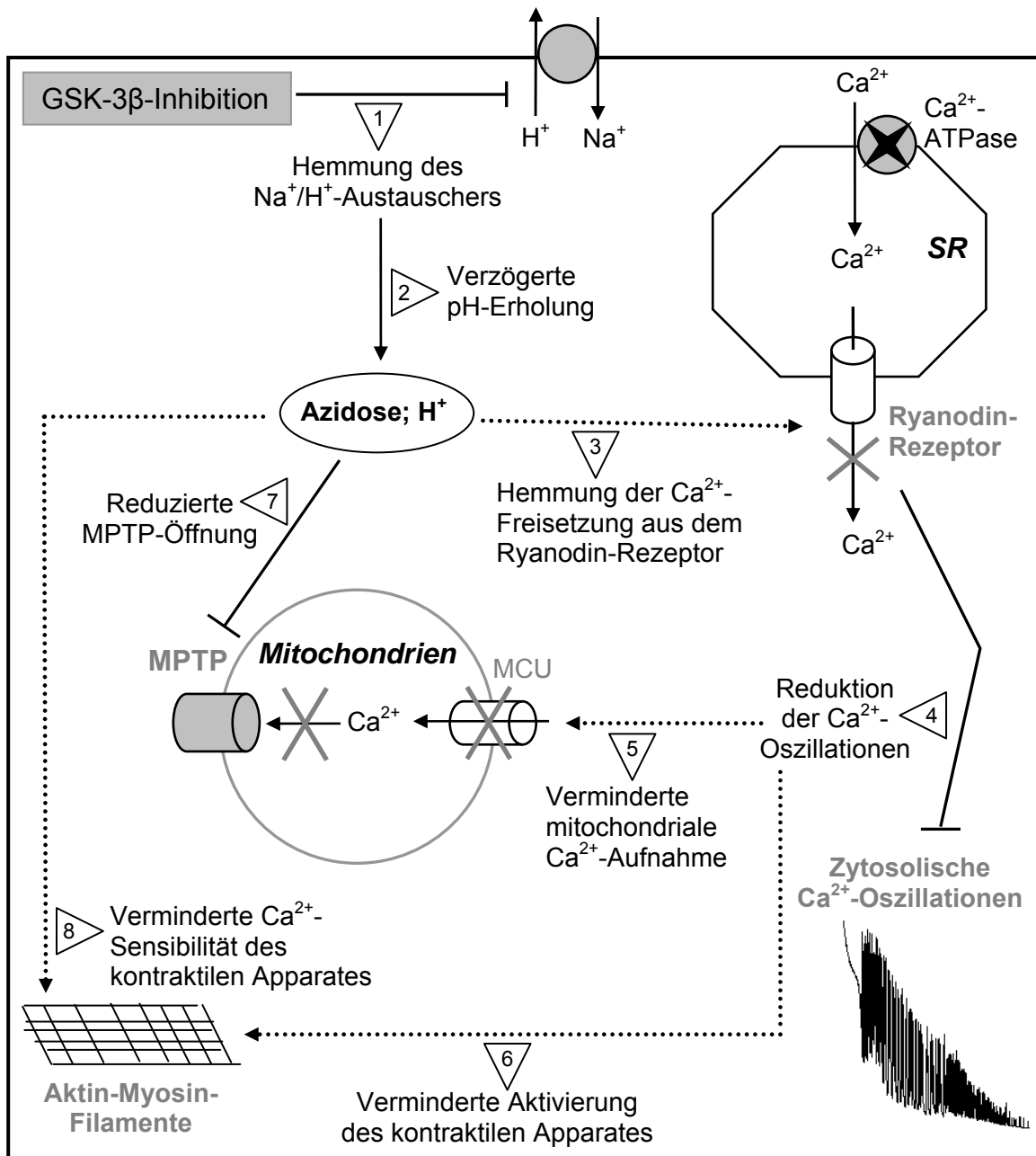


Abb. 5.4 Schematische Darstellung der Protektion gegen den Reperfusionsschaden durch die GSK-3β-Inhibition. Über eine Hemmung des Na⁺/H⁺-Austauschers (1) induziert die GSK-3β-Inhibition eine zytosolische Azidose (2), die die Ryanodin-Rezeptoren des SR hemmt (3). Diese Hemmung der Ryanodin-Rezeptoren führt zur Reduktion der Ca²⁺-Oszillationen (4), was sowohl die Ca²⁺-Aufnahme in die Mitochondrien (5) als auch die Aktivierung des kontraktilen Apparates vermindert (6). Die verminderte mitochondriale Ca²⁺-Aufnahme und die Azidose führen beide zur Hemmung der MPTP-Öffnung (7). Die Azidose führt außerdem zu einer Verminderung der Ca²⁺-Sensibilität des kontraktilen Apparates (8). Über diese verminderte Ca²⁺-Sensibilität und auch verminderte Aktivierung des kontraktilen Apparates (6) wird die Hyperkontraktur verhindert. Die Hemmung der Hyperkontraktur und der MPTP-Öffnung schützt die Kardiomyozyten vor dem nekrotischen Zelltod.

5.4 Klinische Aspekte

In den letzten Jahren gab es mehrere Studien, die die Rolle der Glykogen-Synthase-Kinase-3 β bei verschiedenen kardialen Störungen wie Reperfusionsschaden und Myokardhypertrophie erforscht haben. In diesem Zusammenhang wurde die Wirkung des GSK-3 β -Inhibitors SB216763 auf das ischämisch-reperfundierte Herz untersucht und es konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der GSK-3 β während der Reperfusion die Infarktgröße signifikant reduzieren kann [Park et al., 2006; Gross et al., 2007; Gomez et al., 2008; Mozaffari und Schaffer, 2008].

Es wurde außerdem gezeigt, dass die GSK-3 β -Hemmung während der Reperfusion zu einer Verbesserung der linksventrikulären Funktion ischämisch-reperfundierter Herzen führt [Omar et al., 2010]. Trotz dieser Studien ist nur wenig über die Mechanismen bekannt, die diesen kardioprotektiven Wirkungen zu Grunde liegen. In den meisten Studien wurden die MPTP als Target der protektiven GSK-3 β -Hemmung diskutiert.

Die deutlichen kardioprotektiven Ergebnisse, die mit SB216763 in Tierversuchen erzielt wurden, zeigen die Notwendigkeit der Weiterverfolgung der GSK-3 β -Hemmung als Ansatz für die Reperfusionstherapie. Hier ist die Gewinnung neuer Kenntnisse über die zellulären Mechanismen, über die die GSK-3 β -Hemmung kardioprotektiv wirkt, von entscheidender Bedeutung.

In dieser Arbeit haben wir an isolierten Kardiomyozyten gezeigt, dass eine Hemmung der GSK-3 β vor dem myokardialen Reperfusionsschaden schützt und dass die Beeinflussung mehrerer schädlicher zellulärer Vorgänge wie Ca^{2+} -Oszillationen, Hyperkontraktur, MPTP-Öffnung und letztendlich die Nekrose in diesem Schutz involviert ist. Unsere Arbeit hat außerdem die Azidose in der Frühphase der Reperfusion und den Na^+/H^+ -Austauscher als wichtige Glieder der Kardioprotektion gegen den Reperfusionsschaden durch die GSK-3 β -Inhibition identifiziert. Diese Ergebnisse tragen zu einem besseren Verständnis des zellulären Geschehens bei der protektiven Hemmung der GSK-3 β bei, was eine Voraussetzung für die klinische Anwendung der GSK-3 β -Inhibitoren ist.

Der therapeutische Einsatz eines GSK-3 β -Inhibitors ist in der Klinik nicht unbekannt. Zu den Erkrankungen, bei denen GSK-3 β eine Rolle spielt, gehören z.B. verschiedene neuronale Störungen wie Alzheimer und die manisch-depressiven Erkrankungen [Imahori und Uchida, 1997; Miller et al., 1999; Kim und Kimmel, 2000]. Hier wird der GSK-3 β -Inhibitor Lithium [Stambolic et al., 1996; Ryves und Harwood,

2001] seit Jahren in der Behandlung von manisch-depressiven Erkrankungen erfolgreich eingesetzt. Obwohl GSK-3 β in vielen Signalwegen beteiligt ist, führt die Behandlung mit Lithium zu keiner Zunahme von Krebserkrankungen oder anderen schweren Nebenwirkungen [Cohen et al., 1998; Sun et al., 2007].

Auf dem Gebiet der Kardioprotektion konnte in letzter Zeit gezeigt werden, dass Lithiumchlorid in einer Konzentration von 1 mM (dieselbe Konzentration, die in unserer Arbeit verwendet wurde) die Infarktgröße am ischämisch-reperfundierten Herzen signifikant senkt [Mozaffari und Schaffer, 2008].

Die Tatsache, dass ein GSK-3 β -Inhibitor schon seit Jahren als Medikament erfolgreich eingesetzt wird, dass dieser GSK-3 β -Inhibitor zu keinen schweren Nebenwirkungen führt und dass derselbe GSK-3 β -Inhibitor in dieser Studie und in anderen Studien kardioprotektiv wirkt, lässt hoffen, dass die GSK-3 β -Inhibitoren auch in der Therapie des Reperfusionsschadens Anwendung finden könnten.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Reperfusion gilt heute als die Therapie der Wahl beim Herzinfarkt, der nach wie vor die Haupttodesursache in den Industrienationen darstellt. Allerdings führt die Reperfusion im infarzierten Herzareal zu einem „Reperfusionsschaden“, der sich in Form von Hyperkontraktur und Nekrose manifestiert. Aus mehreren Studien ist bekannt, dass der Reperfusionsschaden durch Interventionen am Anfang der Reperfusion reduziert werden kann. In den letzten Jahren wurde die Hemmung der Glykogen-Synthase-Kinase-3 β (GSK-3 β) als ein Ansatz für die Protektion gegen kardiale Komplikationen wie Myokardhypertrophie und Reperfusionsschaden diskutiert.

Die Hauptaufgabe der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen,

1. ob die GSK-3 β -Hemmung während der Reperfusion den akuten myokardialen Reperfusionsschaden an isolierten Kardiomyozyten reduzieren kann und
2. welche zellulären Mechanismen dieser Protektion gegen den Reperfusionsschaden zu Grunde liegen.

Die Ergebnisse unserer Arbeit zeigen:

1. Die Hemmung der GSK-3 β während der Reperfusion schützt die Kardiomyozyten vor der Reperfusion-induzierten Entwicklung von Hyperkontraktur und Nekrose.
2. Dieser protektive Effekt ist auf eine Reduktion der zytosolischen Ca²⁺-Oszillationen und eine verminderte Öffnung von mitochondrialen Permeabilität-Transition-Poren (MPTP) während der Reperfusion durch die GSK-3 β -Inhibition zurückzuführen.
3. Ursache für die Reduktion der zytosolischen Ca²⁺-Oszillationen und die verminderte MPTP-Öffnung ist die Beibehaltung der Ischämie-bedingten Azidose durch verzögerte pH-Erholung der Kardiomyozyten in den ersten Minuten der Reperfusion.
4. Dieser Verzögerung der pH-Erholung der Kardiomyozyten in der Frühphase der Reperfusion liegt eine Hemmung des Na⁺/H⁺-Austauschers durch die GSK-3 β -Inhibition zu Grunde.

7 SUMMARY

Reperfusion is the therapy of choice for myocardial infarction, which is the main cause of death in industrialized countries. However, reperfusion leads to “reperfusion injury” in the infarcted area, which is manifested by myocardial hypercontracture and necrosis. Several studies have reported that reperfusion injury can be reduced by interventions at the onset of reperfusion. During the last few years, the inhibition of glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β), as a target for protection against cardiac complications like myocardial hypertrophy and reperfusion injury, has been discussed.

The aim of the present study was to investigate,

1. whether inhibition of GSK-3 β during reperfusion can reduce the acute myocardial reperfusion injury in isolated cardiomyocytes, and
2. by which cellular mechanisms is this protection against the reperfusion injury.

The results of our study show:

1. Inhibition of GSK-3 β during reperfusion protects cardiomyocytes against the reperfusion-induced development of hypercontracture and necrosis.
2. This protective effect is due to a reduction in the cytosolic Ca²⁺-oscillations and an inhibition of the opening of mitochondrial permeability transition pores (MPTP) during reperfusion via inhibition of GSK-3 β .
3. The reduction in cytosolic Ca²⁺-oscillations and MPTP-opening is due to sustained ischemia-induced acidosis via delayed pH-recovery of cardiomyocytes during the early period of reperfusion.
4. This delayed pH-recovery of cardiomyocytes during the early phase of reperfusion is due to an inhibition of the Na⁺/H⁺-exchanger via inhibition of GSK-3 β .

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. **Abdallah Y, Gkatzoflia A, Pieper H, Zoga E, Walther S, Kasseckert S, Schäfer M, Schlüter KD, Piper HM, Schäfer C (2005).** Mechanism of cGMP-mediated protection in a cellular model of myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res*; 66:123-31.
2. **Abdallah Y, Gkatzoflia A, Gligorievski D, Kasseckert S, Euler G, Schlüter KD, Schäfer M, Piper HM, Schäfer C (2006).** Insulin protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture by a survival pathway targeting SR Ca²⁺ storage. *Cardiovasc Res*; 70:346-53.
3. **Agullo´ L, Garcí'a-Dorado D, Inserte J, Paniagua A, Pyrhonen P, Llevadot J, Soler-Soler J (1999).** L-Arginine limits myocardial cell death secondary to hypoxia– reoxygenation by a cGMPdependent mechanism. *Am J Physiol*; 45:H1574– 80.
4. **Allshire A, Piper HM, Cuthbertson KS, Cobbold PH (1987).** Cytosolic free Ca²⁺ in single rat heart cells during anoxia and reoxygenation. *Biochem J*; 244(2):381-5.
5. **Anderson SE, Murphy E, Steenbergen C, London RE, Cala PM (1990).** Na⁺/H⁺ exchange in myocardium: effects of hypoxia and acidification on Na and Ca. *Am J Physiol*; 259(6 Pt 1):C940-8.
6. **Ballou LM, Tian PY, Lin HY, Jiang YP, Lin RZ (2001).** Dual regulation of glycogen synthase kinase-3 β by the α_{1A} -adrenergic receptor. *J Biol Chem*; 276:40910–40916.
7. **Bhamra GS, Hausenloy DJ, Davidson SM, Carr RD, Paiva M, Wynne AM, Mocanu MM, Yellon DM (2008).** Metformin protects the ischemic heart by the Akt-mediated inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening. *Basic Res Cardiol*; 103(3):274-84.

8. **Bijur GN, Jope RS (2003).** Glycogen synthase kinase-3 beta is highly activated in nuclei and mitochondria. *Neuroreport*; 14:2415–2419.
9. **Bopassa JC, Ferrera R, Gateau-Roesch O, Couture-Lepetit E, Ovize M (2006).** PI3-kinase regulates the mitochondrial transition pore in controlled reperfusion and postconditioning. *Cardiovasc Res*; 69:178-85.
10. **Bradford MM (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*; 72:248-54.
11. **Cohen P, Frame S (2001).** The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 2:769–776.
12. **Cohen Y, Chetrit A, Sirota P, Modan B (1998).** Cancer morbidity in psychiatric patients: influence of lithium carbonate treatment. *Med Oncol*; 15:32-6.
13. **Cross DA, Alessi DR, Vandenheede JR, McDowell HE, Hundal HS, Cohen P (1994).** The inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin or insulin-like growth factor 1 in the rat skeletal muscle cell line L6 is blocked by wortmannin, but not by rapamycin: evidence that wortmannin blocks activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in L6 cells between Ras and Raf. *Biochem J*; 303:21–26.
14. **Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA (1995).** Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*; 378:785–789.
15. **Delcommenne M, Tan C, Gray V, Rue L, Woodgett J, Dedhar S (1998).** Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 95:11211–11216.

16. **Di Lisa F (2001).** Mitochondrial contribution in the progression of cardiac ischemic injury. *IUBMB Life*; 52(3-5):255-61.
17. **Embi N, Rylatt DB, Cohen P (1980).** Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur J Biochem*; 107, 519-27.
18. **Fabiato A, Fabiato F (1978).** Effects of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscles. *J Physiol*; 276:233-55.
19. **Fang X, Yu SX, Lu Y, Bast RC Jr, Woodgett JR, Mills GB (2000).** Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 97:11960–11965.
20. **Ganote CE (1983).** Contraction bands necrosis and irreversible myocardial injury. *J Mol Cell Cardiol*; 15:67-73.
21. **Garcia-Dorado D, Theroux P, Duran JM, Solares J, Alonso J, Sanz E, Munoz R, Elizaga J, Botas J, Fernandez-Avilés F (1992).** Selective inhibition of the contractile apparatus: a new approach to modification of infarct size, infarct composition, and infarct geometry during coronary artery occlusion and reperfusion. *Circulation*; 85:1160-74.
22. **Garcia-Dorado D, Inserte J, Ruiz-Meana M, González MA, Solares J, Juliá M, Barrabés JA, Soler-Soler J (1997).** Gap junction uncoupler heptanol prevents cell-to-cell progression of hypercontracture and limits necrosis during myocardial reperfusion. *Circulation*; 96(10):3579-86.
23. **Garcia-Dorado D (2004).** Myocardial reperfusion injury: a new view. *Cardiovasc Res*. 61:363-4.

24. **Garcia-Dorado D, Rodriguez-Sinovas A, Ruiz-Meana M, Inserte J, Agulló L, Cabestrero A (2006).** The end-effectors of preconditioning protection against myocardial cell death secondary to ischemia-reperfusion. *Cardiovasc Res*; 70(2):274-85.
25. **Gateau-Roesch O, Argaud L, Ovize M (2006).** Mitochondrial permeability transition pore and postconditioning. *Cardiovasc Res*; 70:264-73.
26. **Gomez L, Thibault H, Gharib A, Dumont JM, Vuagniaux G, Scalfaro P, Derumeaux G, Ovize M (2007).** Inhibition of mitochondrial permeability transition improves functional recovery and reduces mortality following acute myocardial infarction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 293(3):H1654-61.
27. **Gomez L, Paillard M, Thibault H, Derumeaux G, Ovize M (2008).** Inhibition of GSK3 β by postconditioning is required to prevent opening of the mitochondrial permeability transition pore during reperfusion. *Circulation*; 117(21):2761-8.
28. **Griffiths EJ (2009).** Mitochondrial calcium transport in the heart: physiological and pathological roles. *J Mol Cell Cardiol*; 46(6):789-803.
29. **Grimes CA, Jope RS (2001).** The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 β in cellular signaling. *Prog Neurobiol*; 65:391–426.
30. **Gross ER, Hsu AK, Gross GJ (2007).** GSK3 β inhibition and K(ATP) channel opening mediate acute opioid-induced cardioprotection at reperfusion. *Basic Res Cardiol*; 102(4):341-9.
31. **Haigney MC, Miyata H, Lakatta EG, Stern MD, Silverman HS (1992).** Dependence of hypoxic cellular calcium loading on Na(+)-Ca²⁺ exchange. *Circ Res*; 71(3):547-57.

32. **Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA (2004).** Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res*; 61:372-85.
33. **Harwood AJ (2001).** Regulation of GSK-3: a cellular multiprocessor. *Cell*; 105:821–824.
34. **Hausenloy DJ, Yellon DM (2004).** New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res*; 61:448-60.
35. **Hausenloy DJ, Yellon DM (2007).** Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection. *Heart Fail Rev*; 12:217-34.
36. **Hempel A, Friedrich M, Schlüter KD, Forssmann WG, Kuhn M, Piper HM (1997).** ANP protects against reoxygenation-induced hypercontracture in adult cardiomyocytes. *Am J Physiol*; 273(1 Pt 2):H244-9.
37. **Hughes K, Nikolakaki E, Plyte SE, Totty NF, Woodgett JR (1993).** Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation. *EMBO J*; 12:803–808.
38. **Imahori K, Uchida T (1997).** Physiology and pathology of tau protein kinases in relation to Alzheimer's disease. *J Biochem (Tokyo)*; 121:179–188.
39. **Inserte J, Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Padilla F, Barrabés JA, Pina P, Agulló L, Piper HM, Soler-Soler J (2002).** Effect of inhibition of Na(+)/Ca(2+) exchanger at the time of myocardial reperfusion on hypercontracture and cell death. *Cardiovasc Res*; 55:739-48.
40. **Kim L, Kimmel AR (2000).** GSK3, a master switch regulating cell-fate specification and tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev*; 10:508–514.

41. **Kitakaze M, Asakura M, Kim J, Shintani Y, Asanuma H, Hamasaki, T Seguchi O, Myoishi M, Minamino T, Ohara T, Nagai Y, Nanto S, Watanabe K, Fukuzawa S, Hirayama A, Nakamura N, Kimura K, Fujii K, Ishihara M, Saito Y, Tomoike H, Kitamura S; J-WIND investigators (2007).** Human atrial natriuretic peptide and nicorandil as adjuncts to reperfusion treatment for acute myocardial infarction (J-WIND): two randomised trials. *Lancet*; 370:1483-93.
42. **Kyhse-Andersen J (1984).** Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Biochem Biophys Methods*; 10: 203-209.
43. **Ladilov YV, Siegmund B, Piper HM (1995).** Protection of reoxygenated cardiomyocytes against hypercontracture by inhibition of Na^+/H^+ exchange. *Am J Physiol*; 268:H1531-1539.
44. **Ladilov Y, Haffner S, Balser-Schäfer C, Maxeiner H, Piper HM (1999).** Cardioprotective effects of KB-R7943: a novel inhibitor of the reverse mode of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger. *Am J Physiol*; 276(6 Pt 2):H1868-76.
45. **Laemmli UK (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 227(5259):680-5.
46. **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951).** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*; 193(1):265-75.
47. **Marban E, Kusuoka H (1987).** Maximal Ca^{2+} -activated force and myofilament Ca^{2+} sensitivity in intact mammalian hearts. Differential effects of inorganic phosphate and hydrogen ions. *J Gen Physiol*; 90(5):609-23.
48. **Miller JR, Hocking AM, Brown JD, Moon RT (1999).** Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/ β -catenin and Wnt/ Ca^{2+} pathways. *Oncogene*; 18:7860–7872.

49. **Miura T, Miki T (2009).** GSK-3 β , a therapeutic target for cardiomyocyte protection. *Circ J*; 73(7):1184-92.
50. **Morisco C, Zebrowski D, Condorelli G, Tsichlis P, Vatner SF, Sadoshima J (2000).** The Akt-glycogen synthase kinase 3 β pathway regulates transcription of atrial natriuretic factor induced by β -adrenergic receptor stimulation in cardiac myocytes. *J Biol Chem*; 275:14466–14475.
51. **Mozaffari MS, Schaffer SW (2008).** Effect of pressure overload on cardioprotection of mitochondrial KATP channels and GSK-3 β : interaction with the MPT pore. *Am J Hypertens*; 21(5):570-5. Epub 2008 Mar 20.
52. **Nichols CG, Lederer WJ (1990).** The role of ATP in energy-deprivation contractures in unloaded rat ventricular myocytes. *Can J Physiol Pharmacol*; 68(2):183-94.
53. **Nicolli A, Petronilli V, Bernardi P (1993).** Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by matrix pH. Evidence that the pore open-closed probability is regulated by reversible histidine protonation. *Biochemistry*; 32(16):4461-5.
54. **Nicolli A, Basso E, Petronilli V, Wenger RM, Bernardi P (1996).** Interactions of cyclophilin with the mitochondrial inner membrane and regulation of the permeability transition pore, and cyclosporin A-sensitive channel. *J Biol Chem*; 271(4):2185-92.
55. **Omar MA, Wang L, Clanachan AS (2010).** Cardioprotection by GSK-3 Inhibition: Role of Enhanced Glycogen Synthesis and Attenuation of Calcium Overload. *Cardiovasc Res*. 2010 Jan 6. (Abstract)
56. **Owens LM, Fralix TA, Murphy E, Cascio WE, Gettes LS (1996).** Correlation of ischemia-induced extracellular and intracellular ion changes to cell-to-cell electrical uncoupling in isolated blood-perfused rabbit hearts. Experimental Working Group. *Circulation*; 94(1):10-3.

57. **Park SS, Zhao H, Mueller RA, Xu Z (2006).** Bradykinin prevents reperfusion injury by targeting mitochondrial permeability transition pore through glycogen synthase kinase 3beta. *J Mol Cell Cardiol*; 40:708-16.
58. **Padilla F, Garcia-Dorado D, Agulló L, Inserte J, Paniagua A, Mirabet S, Barrabés JA, Ruiz-Meana M, Soler-Soler J (2000).** L-Arginine administration prevents reperfusion-induced cardiomyocyte hypercontracture and reduces infarct size in the pig. *Cardiovasc Res*; 46(3):412-20.
59. **Padilla F, Garcia-Dorado D, Agulló L, Barrabés JA, Inserte J, Escalona N, Meyer M, Mirabet M, Pina P, Soler-Soler J (2001).** Intravenous administration of the natriuretic peptide urodilatin at low doses during coronary reperfusion limits infarct size in anesthetized pigs. *Cardiovasc Res*; 51(3):592-600.
60. **Pike MM, Luo CS, Clark MD, Kirk KA, Kitakaze M, Madden MC, Cragoe EJ Jr, Pohost GM (1993).** NMR measurements of Na⁺ and cellular energy in ischemic rat heart: role of Na⁺-H⁺ exchange. *Am J Physiol*; 265(6 Pt 2):H2017-26.
61. **Piot C, Croisille P, Staat P, Thibault H, Rioufol G, Mewton N, Elbelghiti R, Cung TT, Bonnefoy E, Angoulvant D, Macia C, Raczka F, Sportouch C, Gahide G, Finet G, André-Fouët X, Revel D, Kirkorian G, Monassier JP, Derumeaux G, Ovize M (2008).** Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 31;359(5):473-81.
62. **Piper HM, Probst I, Schwartz P, Hütter FJ, Spieckermann PG (1982).** Culturing of calcium stable adult cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*; 14(7):397-412.
63. **Piper HM, Garcia-Dorado D, Ovize M (1998).** A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res*; 38:291-300.

64. **Piper HM, Abdallah Y, Schafer C (2004).** The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovasc Res*; 61:365-3671.
65. **Piper HM, Kasseckert S, Abdallah Y (2006).** The sarcoplasmic reticulum as the primary target of reperfusion protection. *Cardiovasc Res*; 70:170-3.
66. **Piper HM, Kasseckert SA, Schlüter KD, Abdallah Y (2008).** Pathophysiologie des myokardialen Reperfusionsschadens. *Dtsch Med Wochenschr*; 133:586-90.
67. **Piper HM, Abdallah Y, Kasseckert S, Schlüter KD (2008).** Sarcoplasmic reticulum-mitochondrial interaction in the mechanism of acute reperfusion injury. Viewpoint. *Cardiovasc Res*; 77(2):234-6.
68. **Roos A, Boron WF (1981).** Intracellular pH. *Physiol Rev*; 61(2):296-434.
69. **Rylatt DB, Aitken A, Bilham T, Condon GD, Embi N, Cohen P (1980).** Glycogen synthase from rabbit skeletal muscle. Amino acid sequence at the sites phosphorylated by glycogen synthase kinase-3, and extension of the N-terminal sequence containing the site phosphorylated by phosphorylase kinase. *Eur J Biochem*; 107(2):529-37.
70. **Ryves JW, Harwood AJ (2001).** Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 by competition for magnesium. *Biochem Biophys Res Comm*; 280:20-25.
71. **Sack MN, Yellon DM (2003).** Insulin therapy as an adjunct to reperfusion after acute coronary ischemia: a proposed direct myocardial cell survival effect independent of metabolic modulation. *J Am Coll Cardiol*; 41:1404-7.
72. **Schäfer C, Ladilov Y, Inserte J, Schäfer M, Haffner S, Garcia-Dorado D, Piper HM (2001).** Role of the reverse mode of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury. *Cardiovasc Res*; 51:241-50.

73. **Schlack W, Uebing A, Schäfer M, Bier F, Schäfer S, Piper HM, Thämer V (1994).** Regional contractile blockade at the onset of reperfusion reduces infarct size in the dog heart. *Pflugers Arch*; 428(2):134-41.
74. **Schlüter KD, Schwartz P, Siegmund B, Piper HM (1991).** Prevention of the oxygen paradox in hypoxic-reoxygenated hearts. *Am J Physiol*; 261(2 Pt 2):H416-23.
75. **Schlüter KD, Weber M, Schraven E, Piper HM (1994).** NO donor SIN-1 protects against reoxygenation-induced cardiomyocyte injury by a dual action. *Am J Physiol*; 267(4 Pt 2):H1461-6.
76. **Sebbag L, Verbinski SG, Reimer KA, Jennings RB (2003).** Protection of ischemic myocardium in dogs using intracoronary 2,3-butanedione monoxime (BDM). *J Mol Cell Cardiol. Feb*;35(2):165-76.
77. **Siegmund B, Klietz T, Schwartz P, Piper HM (1991).** Temporary contractile blockade prevents hypercontracture in anoxic-reoxygenated cardiomyocytes. *Am J Physiol* 260:H426-35.
78. **Siegmund B, Zude R, Piper HM (1992).** Recovery of anoxic-reoxygenated cardiomyocytes from severe Ca²⁺ overload. *Am J Physiol*; 263(4 Pt 2):H1262-9.
79. **Siegmund B, Schlüter KD, Piper HM (1993).** Calcium and the oxygen paradox. *Cardiovasc Res*; 27(10):1778-83.
80. **Siegmund B, Schlack W, Ladilov YV, Balser C, Piper HM (1997).** Halothane protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture. *Circulation*; 96:4372-9.
81. **Snabaitis AK, Cuello F, Avkiran M (2008).** Protein kinase B/Akt phosphorylates and inhibits the cardiac Na⁺/H⁺ exchanger NHE1. *Circ Res*; 103(8):881-90.

82. **Staat P, Rioufol G, Piot C, Cottin Y, Cung TT, L'Huillier I, Aupetit JF, Bonnefoy E, Finet G, André-Fouët X, Ovize M (2005).** Postconditioning the human heart. *Circulation*; 112:2143-8.
83. **Stambolic V, Woodgett JR (1994).** Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3 β in intact cells via serine 9 phosphorylation. *Biochem J*; 303:701–704.
84. **Stambolic V, Ruel L, Woodgett JR (1996).** Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signaling in intact cells. *Curr Biol*; 6:1664-68.
85. **Sun A, Shanmugam I, Song J, Terranova PF, Thrasher JB, Li B (2007).** Lithium suppresses cell proliferation by interrupting E2F-DNS interaction and subsequently reducing S-phase gene expression in prostate cancer. *Prostate*; 67(9):976-88.
86. **Sutherland C, Leighton IA, Cohen P (1993).** Inactivation of glycogen synthase kinase-3 β by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochem J*; 296:15–19.
87. **Thibault H, Piot C, Staat P, Bontemps L, Sportouch C, Rioufol G, Cung TT, Bonnefoy E, Angoulvant D, Aupetit JF, Finet G, André-Fouët X, Macia JC, Raczka F, Rossi R, Itti R, Kirkorian G, Derumeaux G, Ovize M (2008).** Long-term benefit of postconditioning. *Circulation*; 117:1037-4.
88. **Tong H, Imahashi K, Steenbergen C, Murphy E (2002).** Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 β during preconditioning through a phosphatidylinositol-3-kinase--dependent pathway is cardioprotective. *Circ Res*; 90(4):377-9
89. **Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, Yellon DM (2004).** Postconditioning: a form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circ Res*; 95:230-232.

90. **Tsujio I, Tanaka T, Kudo T, Nishikawa T, Shinozaki K, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Takeda M (2000).** Inactivation of glycogen synthase kinase-3 by protein kinase C δ : implications for regulation of tau phosphorylation. *FEBS Lett*; 469:111–117.
91. **Ventura-Clapier R, Veksler V (1994).** Myocardial ischemic contracture, Metabolites affect rigor tension development and stiffness. *Circ Res*; 74:920-9.
92. **Wang QM, Fiol CJ, DePaoli-Roach AA, Roach PJ (1994).** Glycogen synthase kinase-3 β is a dual specificity kinase differentially regulated by tyrosine and serine/threonine phosphorylation. *J Biol Chem*; 269:14566–14574.
93. **Woodgett JR (2001).** Judging a protein by more than its name: GSK-3. *Sci STKE*; 100:RE12.
94. **Yellon DM, Hausenloy DJ (2007).** Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*. 13;357(11):1121-35.

9 ERKLÄRUNG

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

(Wisam Iraqi)

10 DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. Dr. H. Michael Piper danke ich für die Bereitstellung des Themas und des Arbeitsplatzes innerhalb des Physiologischen Instituts, für die hervorragende Betreuung und die hilfreiche Kritik, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meine größte Dankbarkeit gilt Herrn PD Dr. Yaser Abdallah. Für die intensive Unterstützung, für die engagierte Betreuung meiner Arbeit und die wertvollen Anregungen möchte ich ihm ganz herzlich danken.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Herrn Dr. Muhammad Aslam für seine freundliche Hilfe und Unterstützung, für seinen großen Einsatz und für seine unzähligen nützlichen Ratschläge.

Recht herzlich möchte ich mich bei Dr. Sascha A. Kasseckert für seine Hilfe und seine zahlreichen guten Ratschläge bedanken.

Herrn PD Dr. Thomas Noll, Frau Dr. Frauke Härtel und Frau Dr. Jacqueline Heger danke ich für ihre freundliche Hilfe und ihre hilfreiche Kritik.

Den technischen Assistenten/innen des Physiologischen Instituts, insbesondere Sergej Kechter, Daniela Schreiber, Yvonne Horn, Anna Reis und Birgit Störr möchte ich für ihre Hilfe ganz herzlich danken.

Für ihre Unterstützung und für ihre Freundlichkeit danke ich meinen Kollegen im Calciumlabor: Sabrina Raffenberg, Mustafa Micoogulari, Alexandra Woste, Victoria Johnson und besonders Tayyab Shahzad.

Für das nette Arbeitsklima danke ich allen anderen Mitgliedern des Physiologischen Instituts, besonders Dr. M. Arshad, M. Assad Riaz, Yvonne Osygus, Mona Prieß und Claudia Harjung.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die mir während meines Studiums und meiner Doktorarbeit mit allen Mitteln zur Seite gestanden hat.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

Veröffentlichungen

Yaser Abdallah, Wisam Iraqi, Maher Said, Sascha A. Kasseckert, Tayyab Schahzad, Ali Erdogan, Christiane Neuhoﬀ, Dürsün Gündüz, Klaus-Dieter Schlüter, H. Michael Piper, H. Peter Reusch, Yury Ladilov (2010). Interplay between Ca(2+) cycling and mitochondrial permeability transition pores promotes reperfusion-induced injury of cardiac myocytes. J Cell Mol Med. 2010 Dec 28. doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01249.x. [Epub ahead of print]

Vorträge und Posterpräsentationen

W. Iraqi, T Shahzad, S A Kasseckert, V C Kratz, H M Piper, Y Abdallah.

Inhibition of Glycogen Synthase Kinase-3Beta (GSK-3β) protects cardiac myocytes against reperfusion injury through inhibition of mitochondrial permeability transition pore.

87th Annual Meeting of the German Physiological Society, March 2008, Cologne.

W. Iraqi, T. Shahzad, S. Kasseckert, H. M. Piper, Y. Abdallah.

Hemmung der Glycogen-Synthase-Kinase-3β schützt Herzmuskelzellen gegen den akuten myokardialen Reperfusionsschaden durch Hemmung der mitochondrialen Permeabilität-Transition-Poren.

74. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung, März 2008, Mannheim.

Iraqi, W.

Protection of cardiac myocytes against reperfusion injury through inhibition of Glycogen Synthase Kinase-3β (GSK-3β).

1st GGL Conference on Life Sciences, September - October 2008, Giessen.

W. Iraqi, T. Shahzad, S. A. Kasseckert, H. M. Piper, Y. Abdallah.

Protection of cardiac myocytes against reperfusion injury through Inhibition of Glycogen Synthase Kinase-3β (GSK-3β) involves the mitochondrial permeability transition pore (MPTP).

88th Annual Meeting of the German Physiological Society. March 2009, Giessen.

Iraqi, W.

Glycogen synthase kinase-3 β induces collapse of mitochondrial membrane potential and opening of mitochondrial permeability transition pore in ischemic-reperfused cardiac myocytes.

2nd GGL Conference on Life Sciences, September - October 2009, Giessen.

W Iraqi, T Shahzad, M Aslam, S A Kasseckert, Y Abdallah.

The decelerated cellular pH recovery through inhibition of glycogen synthase kinase 3- β protects cardiac myocytes against reperfusion injury.

Joint Meeting of the Scandinavian and German Physiological Societies, March 2010, Copenhagen.

W Iraqi, T Shahzad, M Aslam, S A Kasseckert, Y Abdallah.

Die verzögerte zelluläre pH-Erholung durch Hemmung der Glycogen-Synthase-Kinase-3 β schützt Herzmuskelzellen vor dem Reperfusionsschaden.

76. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung, April 2010, Mannheim.

W. Iraqi, T. Shahzad, S.A. Kasseckert, M. Aslam, A. Erdogan, K.D. Schlueter, D. Sedding, H. Tillmanns, H.M. Piper, Y. Abdallah.

The delayed cellular pH_i recovery through inhibition of glycogen synthase kinase 3- β protects cardiac myocytes against reperfusion injury.

European Society of Cardiology, ESC Congress 2010, August - September 2010 , Stockholm - Sweden

Wisam Iraqi



Studium der Humanmedizin {Abschluss 2006 an der JLU Gießen, Zeugnis über die Ärztliche Prüfung}

Graduiertenkolleg der Deutschen Forschungsgemeinschaft: „Biologische Grundlagen der Vaskulären Medizin“ {Abschluss 2009}

Gießener Graduiertenschule für die Lebenswissenschaften, GGL (Section 3: Heart, Lung & Blood Vessels) {Abschluss 2010}

Disputation am: 11.03.2011 (Note: Summa cum laude)

Diese Studie untersucht:

Status der Glykogen-Synthase-Kinase-3 β (GSK-3 β) unter Ischämie & Reperfusion

Einfluss der GSK-3 β -Hemmung auf die Ca²⁺-Oszillationen, Hyperkontraktur, mitochondriale Integrität & Nekrose in reperfundierten Kardiomyozyten

Mechanismen der Protektion durch GSK-3 β -Hemmung, besonders die Beeinflussung des zytosolischen pH-Wertes und der Aktivität des Na⁺/H⁺-Austauschers während der Reperfusion

وسام عراقي
درس الطب في جامعة جيسين في المانيا وتخرج سنة ٢٠٠٦ وحصل على منحه للدراسات العليا
يعمل في البحث العلمي والتدريس في كلية الطب وحصل في سنة ٢٠١١ على الدكتوراه في
الطب بدرجة الامتياز



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5738-1



9 783835 119573 8 1